

**Lever X-reseptor (LXR) og glukose- og
lipidmetabolisme i humane muskelceller:
Bruk av ny metode for måling av glukose- og
lipidmetabolisme i 96-brønners plater
("Multiwell - fuel handling")**

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden *Candidata Pharmaciae*



Maja Seigerud

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk Institutt
Det Matematisk-Naturvitenskaplige Fakultet
Universitetet i Oslo
Oktober 2006

**Lever X-reseptor (LXR) og glukose- og
lipidmetabolisme i humane muskelceller:
Bruk av ny metode for måling av glukose- og
lipidmetabolisme i 96-brønners plater
("Multiwell - fuel handling")**

Maja Seigerud

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden *Candidata Pharmaciae*

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk Institutt
Det Matematisk-Naturvitenskaplige Fakultet
Universitetet i Oslo
Oktober 2006



Veiledere

Professor Arild Chr. Rustan

Professor Hege Thoresen

Stipendiat Eili Tranheim Kase

Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse	1
Sammendrag	3
Forord	5
Forkortelser	6
1. Innledning	8
1.1 Type 2-diabetes mellitus	8
1.2 Kjernereseptorer	10
1.2.1 Lever X-reseptorer	11
1.3 Hvorfor er muskel viktig?	15
1.4 Fett- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel	16
1.5 Lever X-reseptorer i skjelettmuskel	18
1.6 LXR-ligandene brukt i oppgaven	19
1.7 Humane skjelettmuskelceller	23
1.8 Multiwell-metoden	24
1.8.1 Bakgrunn for utvikling av metoden	24
1.8.2 Litt om metoden	24
1.8.3 Substrat-oksidasjons forsøk i 96-brønners format	25
1.8.4 Platepressa	27
1.8.5 SPA-forsøk (Scintillation proximity assay)	29
1.9 Mål for oppgaven	30
2. Materialer og metoder	31
2.1 Materialer	31
2.2 Metoder	32
2.2.1 Utsåing av satelittceller	32
2.2.2 Vekst av satelittceller og differensiering til muskelceller	32
2.2.3 Donorkarakteristika	33
2.2.4 Måling av celleassosiert glukose	33
2.2.5 Måling av glukoseoksidasjon (karbondioksid)	34
2.2.6 Måling av celleassosiert fettsyre	35
2.2.7 Måling av fettsyreoksidasjon	36
2.2.8 Analyse av syreløselige metabolitter (ASM)	37
2.2.9 Analyse av cellulært protein	37
2.2.10 Statistisk analyse	38
3. Resultater	39
3.1 Forsøk med oljesyre (OA)	39
3.1.1 Glukose påvirker metabolismen av OA	39
3.1.2 OA-metabolisme- ulike LXR-ligander	40
3.1.3 Glukose påvirker OA-metabolismen- ulike LXR-ligander	44
3.1.4 Glukose påvirker OA-metabolismen- dose-respons 22-S-HC	46
3.1.5 OA-metabolisme- 22-S-HC ± T0901317	48
3.1.6 Sammenligning av kronisk og akutt forbehandling med OA	50
3.1.7 Cerulenin- en FAS-hemmer	53
3.2 Forsøk med ulike glukoseisotoper	57
3.2.1 Sammenligning av glukosemetabolisme- ulike LXR-ligander	57
3.2.2 Glukosemetabolisme- dose-respons 22-S-HC	61
3.2.3 Glukosemetabolisme- 22-S-HC ± T0901317	63

3.2.4	Glukosemetabolisme- 22-S-HC ± insulin.....	65
4.	Diskusjon	67
4.1	Multiwell-metoden	67
4.2	Effekt av glukose på metabolismen av oljesyre (OA)	68
4.3	Effekter av 22-S-hydroksykolesterol (22-S-HC).....	69
4.3.1	Effekter på oljesyremetabolismen	69
4.3.2	Effekter på glukosemetabolismen	70
4.4	Cerulenin	72
4.5	Sammenligning av kronisk og akutt fettsyrebehandling	73
4.6	Effekter av andre LXR-ligander.....	74
4.6.1	Effekter på oljesyremetabolismen	74
4.6.2	Effekter på glukosemetabolismen	76
4.7	Konklusjoner	78
4.8	Hva kan gjøres videre?	79
5.	Litteraturreferanser	81
	Tillegg	84

Sammendrag

Type 2-diabetes er en sykdom i sterk vekst, spesielt i den vestlige delen av verden. Sykdommen medfører metabolske forstyrrelser som hyperglykemi, insulinresistens, endret lipidprofil og redusert metabolsk fleksibilitet. Det er vist at en viktig faktor for utvikling av sykdommen er økt akkumulering av triglyserider i skjelettmuskulatur. Denne lipidakkumuleringen mistenkes å føre til flere av de patofysiologiske endringer ved type 2-diabetes, som insulinresistens og redusert metabolsk fleksibilitet. Lever X-reseptorer (LXR) er ligand-aktiverede transkripsjonsfaktorer som er viktige i reguleringen av kolesterol- og lipidmetabolisme, og som også er involverte i glukosemetabolisme. Den funksjonelle rollen til LXR i skjelettmuskulatur er ikke godt kjent på nåværende tidspunkt.

Forsøkene i denne oppgaven ble utført på humane skjelettmuskelceller i kultur, med en ny metode for metabolismestudier på celler kalt Multiwell-metoden. Metoden innebærer mindre arbeid og større mengde resultater oppnådd på kortere tid sammenlignet med andre tidligere brukte arbeidsmetoder.

Celler kan variere mellom utnyttelse av glukose og fettsyrer som energikilde. Denne evnen kalles metabolsk fleksibilitet og er redusert ved type 2-diabetes, noe som muligens skyldes akkumulering av lipider i skjelettmuskulatur (IMTG) eller mitokondriell dysfunksjon. I denne oppgaven er det vist at fettsyrer fra intracellulære lagringslipider også oksideres. En økning i denne oksidasjonen eller redusert lagring av lipider i skjelettmuskelceller ville teoretisk sett vært gunstig ved type 2-diabetes.

Ulike ligander for LXR ble i denne oppgaven testet ut for effekt på metabolismen av oljesyre og glukose. Det ble sett en klar effekt av T0901317; økning i både opptak og oksidasjon av oljesyre og glukose. Andre ligander som ble testet ut var 22-R-hydroksykolesterol (22-R-HC), 27-hydroksykolesterol (27-HC) og DMHCA (N,N-dimetyl-3 β -hydroksyl-cholenamid). Alle disse tre medførte redusert oksidasjon i forhold til celleassosiert fettsyre i cellene, noe som ikke er gunstig. Det ble også vist at disse ligandene påvirket glukosemetabolismen, men effektene var ikke veldig tydelige. Etter behandling med DMHCA ble det sett hemming av opptak og

oksidasjon av glukose, noe som er ugunstig da det medfører hyperglykemi. Det er lite trolig at noen av disse ligandene vil kunne brukes som legemidler, da de kan føre til ugunstige effekter på lipid- og glukoseomsetning. Cerulenin, en forbindelse som hemmer fettsyresyntase (FAS), ble testet ut for å undersøke om den kunne hemme den lipogene effekten en aktivering av LXR gir, men flere forsøk må utføres før en konklusjon kan trekkes. Den syntetiske LXR-liganden 22-S-hydroksykolesterol (22-S-HC) ble også testet ut, og det ble vist at den har mer gunstige metabolske effekter sammenlignet med de andre LXR-ligandene. Det ble vist redusert lipidoksidasjon, samt økt glukoseopptak og -oksidasjon. Dette er en gunstig virkningsprofil som kan være interessant i forhold til utvikling av nye legemidler mot type 2-diabetes, og mye tyder på 22-S-HC bør undersøkes videre.

Forord

Denne hovedfagsoppgaven ble utført ved Farmasøytisk institutt, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap fra november 2005 til oktober 2006. Jeg ønsker å takke alle på Avdeling for farmasøytisk biovitenskap for et trivelig år sammen med dere.

Jeg vil gjerne få takke mine veiledere professor Arild Chr. Rustan og professor Hege Thoresen for god oppfølging gjennom hovedfaget. Takk for all kunnskap og entusiasme fra deres side, og for god hjelp i skriveprosessen.

Jeg vil også takke stipendiat Eili Tranheim Kase for råd og veiledning gjennom utførelsen av denne oppgaven.

Mange takk til senior forskningstekniker Mari-Ann Baltzersen for opplæring i laboratoriearbeid, og hjelp med arbeid på cellelab'en.

En ekstra takk til Adam Babinski for datakyndig hjelp.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke min forlovede Christer, mine foreldre Eli og Rune og min bror Magnus for støtte og oppmuntring gjennom hele farmasistudiet. Jeg hadde ikke kunnet gjennomføre dette uten dere!

Blindern, oktober 2006

Maja Seigerud

Forkortelser

1-glukose	1-merket glukose
22-R-HC	22-R hydroksykolesterol
22-S-HC	22-S hydroksykolesterol
27-HC	27- hydroksykolesterol
6-glukose	6-merket glukose
ABCA1	ATP-bindende kassett-transportør A1
ACBP	Acyl-CoA-bindende protein
ASM	Syreløselige metabolitter
BMI	Kroppsmasseindeks
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert
CD36/FAT	Fettsyretranslokase
Ci	Curie
CO ₂	Karbondioksid
CPT-1	Karnitin palmitoyltransferase-1
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMHCA	N,N-dimetyl-3β-hydroksyl-cholenamid
DMSO	Dimetylsulfoksid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
FABP	Fettsyre-bindende protein
FAS	Fettsyresyntase
FCS	Føtalt kalveserum
FFA	Frie fettsyrer
FXR	Farnesoid X-reseptor
GLUT	Glukosetransportør
HDL	Høy-tetthets lipoprotein
IMTG	Intramyocellulære triglyserider
LXR	Lever X-reseptorer
LXRE	Lever X-reseptor responselement
mRNA	Budbringer-RNA

OA	Oljesyre (18:1, n-9)
PA	Palmitinsyre (16:0)
PBS	Phosphate buffered saline (høstebuffer)
PCA	Perklorsyre
PPAR γ	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor- γ
RPM	Omdreiningar per minutt
RXR	Retinoid X-reseptor
SCD-1	Stearoyl-CoA desaturase-1
SEM	Standardfeil til gjennomsnittet
SREBP-1c	Sterol regulatorisk element-bindende protein-1c
T2D	Type 2 diabetes
TAG	Triacylglycerol
U-glukose	Uniformsmerket glukose

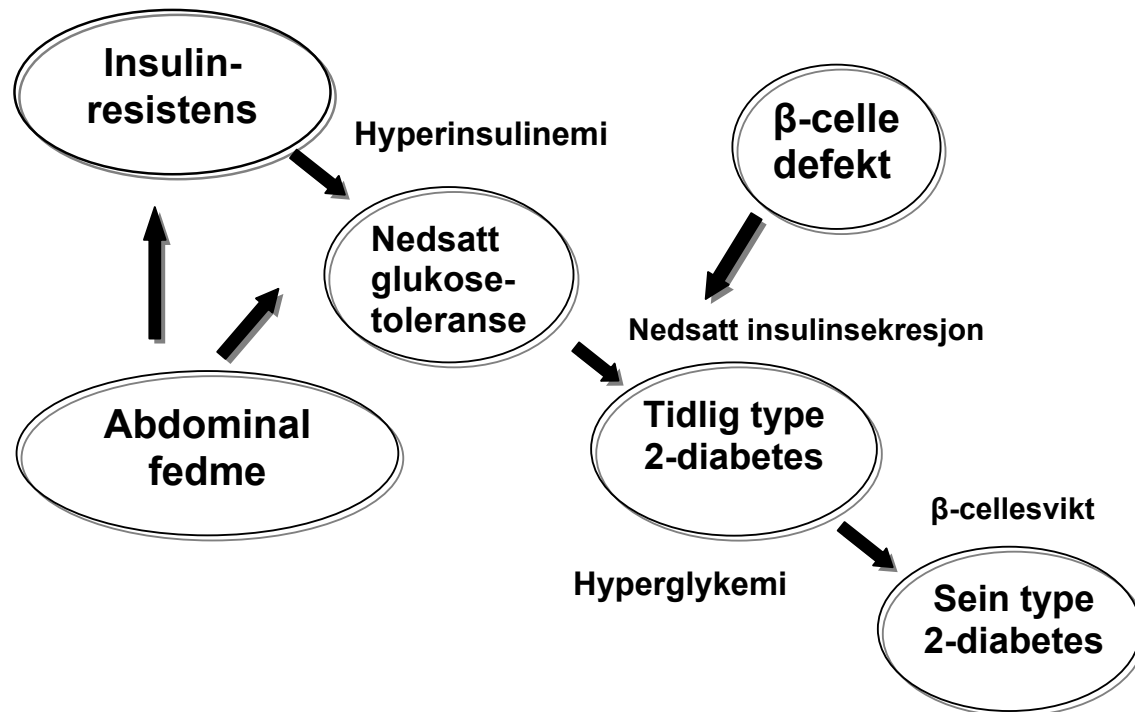
1. Innledning

1.1 Type 2-diabetes mellitus

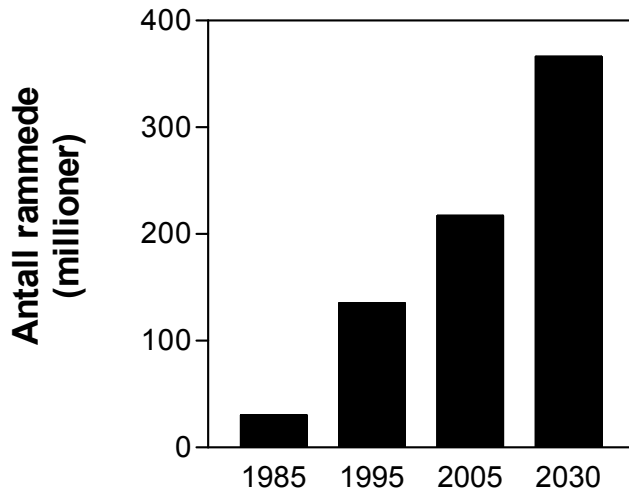
Diabetes mellitus er en kronisk stoffskiftesykdom med høyt blodsukker (hyperglykemi) og andre metabolske forstyrrelser som skyldes insulinmangel, ofte sammen med nedsatt insulinvirksomhet. Type 2-diabetes mellitus skyldes utilstrekkelig insulinproduksjon alene eller i kombinasjon med nedsatt insulinfølsomhet (insulinresistens) i målorganene (1). Man får dermed redusert virkning av insulin i kroppen; redusert insulinstimulert glukosetransport og glukoseomsetning i skjelettmuskulatur, økt lipolyse i fettvev og økt glukoseproduksjon i lever er noen av konsekvensene. Følgene av dette blir hyperglykemi, kompensatorisk hyperinsulinemi og forstyrrelser i blodlipidene (økte triglyserider, redusert HDL-kolesterol) (2, 3). Det er vist at kronisk hyperglykemi øker akkumulering av triglyserider i blant annet skjelettmuskulatur (IMTG) og lipogenese, samt reduserer insulinstimulert glukoseopptak og glykogensyntese (4). Ved type 2-diabetes sees også mitokondriell dysfunksjon, noe som medfører redusert oksidasjon av lipider og glukose. Det mistenkes at den mitokondrielle dysfunksjonen henger sammen med økningen i IMTG som sees ved type 2-diabetes (5). Metabolisme i skjelettmuskulatur vil også være endret ved insulinresistens. En viktig egenskap ved muskel er at fettsyrer fortrinnsvis vil oksideres til energi ved faste, og at glukose oksideres under insulinstimulering etter måltid (postprandialt), noe som fører til at fettsyreoksidasjonen undertrykkes. Dette skiftet i energisubstratutnyttelse kalles metabolsk fleksibilitet, og denne mekanismen er redusert ved insulinresistens og type 2-diabetes samt ved høy prosentandel kroppsfett (6-8). Dette innebærer lavere lipidoksidasjon ved faste, og at oksidasjonen av karbohydrater ikke øker ved insulinstimulering. Den reduserte evnen til å skifte mellom oksidasjon av fett og glukose synes å være relatert til akkumulering av triglyserider i skjelettmuskulatur (IMTG) (9). Denne lipidakkumuleringen er foreslått å kunne påvirke insulin-signaleringsystemet og dermed bidra til den molekylære mekanismen bak insulinresistens i skjelettmuskulatur (8, 10).

Insulinresistens opptrer på et tidlig stadium i utviklingen av type 2-diabetes, før glukoseintoleranse og β -cellesvikt, og antas å være en avgjørende faktor for utvikling av sykdommen (11) (Figur 1.1). En annen indikator på sannsynligheten for å utvikle type 2-diabetes er en samling av ulike risikofaktorer som benevnes "det metabolske syndrom". Flere risikofaktorer indikerer større sannsynlighet for å utvikle type 2-diabetes. Eksempler på slike risikofaktorer er forhøyet fastende blodglukosenivå, fedme, høyt blodtrykk og lipidforstyrrelse (2, 12). Andre risikofaktorer for å utvikle type 2-diabetes er fysisk inaktivitet, økende alder og arvelige faktorer (11).

Type 2-diabetes mellitus er den hyppigst forekommende typen diabetes, og sykdommen er i sterk vekst. Spesielt i den vestlige delen av verden har forekomsten økt lik en epidemi, og man anslår at godt over 150 millioner mennesker verden over er rammet av sykdommen, og at antallet vil fortsette å stige i årene som kommer (11, 13) (Figur 1.2).



Figur 1.1 Utvikling av type 2-diabetes mellitus.



Figur 1.2 Antall mennesker rammet av diabetes i verden. WHO har estimert tallene for år 2030. Tall fra referanse (13).

1.2 Kjernereseptorer

Kjernereseptor-superfamilien består av en gruppe beslektede transkripsjonsfaktorer som regulerer uttrykk av bestemte målgener. Kjernereseptor-superfamilien er den største familien av transkripsjonsfaktorer, og er i hovedsak ligandaktiverte (14).

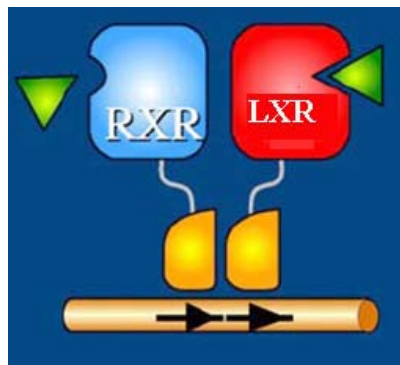
Kjernereseptorene deles videre inn i 4 underklasser, etter DNA-bindende og dimeriserende egenskaper. Lever X-reseptorene klassifiseres som retinoid X-reseptor-dimere (15).

1.2.1 Lever X-reseptorer

Den første humane lever X-reseptor fikk sitt navn da den først ble isolert fra DNA fra lever, og fordi den uttrykkes i stor grad i lever.

Lever X-reseptorer består av to ulike former, $LXR\alpha$ og $LXR\beta$. $LXR\beta$ finnes i nesten alle vev i kroppen, mens $LXR\alpha$ er i størst grad uttrykt i lever og i andre vev med høy metabolsk aktivitet, som nyrer, fettvev, tynntarm og makrofager (16).

LXR påvirker genregulering ved å bindes til spesielle lever X-reseptor-responselementer (LXRE) i promotorene til aktuelle målgener. Her dimeriserer LXR med retinoid X-reseptor (RXR). LXR-RXR heterodimeren aktiveres ved at den binder til seg RXR-agonisten 9-cis retinsyre, en LXR-agonist eller synergistisk ved å binde seg til begge to samtidig (17).



Figur 1.3 LXR-ligand bindes til LXR som danner heterodimer med RXR, bindes til DNA og regulerer genuttrykk. Fra referanse (15).

LXR er viktige i reguleringen av kolesterol- og lipidmetabolisme (18-24), og er også involvert i glukosemetabolisme (22, 25, 26).

Eksempler på gener som reguleres av LXR α og LXR β :

- **ABCA1** (ATP-bindende kassett-transportør A1)

ABCA1 er en transportør som er implisert i transport av cellulært fritt kolesterol, og virker ved å pumpe kolesterol ut fra makrofager, celler i fettvev og skjelettmuskel, til apolipoproteiner. Dette kalles revers kolesteroltransport, og kolesterolet som fjernes fra perifere vev returneres til lever ved hjelp av HDL-partikler for å skilles ut i gallen. ABCA1 er blant annet regulert av LXR (20, 22, 27). Revers kolesteroltransport er gunstig for cellene og virker anti-aterogent. Konsentrasjonen av HDL ("det gode kolesterolet") i blodet øker, noe som er gunstig.

- **SREBP-1c** (Sterol regulatorisk element-bindende protein-1c)

SREBP-1c er en transkripsjonsfaktor som regulerer uttrykk av gener for enzymer involvert i lipogenesen (for eksempel fettsyresyntase (FAS)), og er viktig i lipidhomeostasen. Genene som reguleres er involvert i syntese og opptak av kolesterol og fettsyrer, og lipogenese og lipidakkumulering vil derfor øke ved oppregulering av SREBP-1c. Genet for SREBP-1c er under direkte regulering av LXR. LXR-agonister induserer ekspresjon av SREBP-1c via et LXR-responsivt element i promotoren. Hos mus som mangler genene for LXR vil basalt uttrykk av mRNA for SREBP-1c i lever være signifikant redusert (18, 22, 27). Aktivering av lipogenesen via oppregulering av SREBP-1c er ikke gunstig, da økt lipogenese og lipidakkumulering representerer en potensiell risiko for utvikling av aterosklerose og insulinresistens.

- **FAS** (Fettsyresyntase)

FAS er et sentralt enzym i lipogenesen. Det katalyserer alle trinnene i fettsyresyntesen fra malonyl-CoA til palmitat. LXR regulerer FAS, og LXR-knockout mus har redusert ekspresjon av FAS-mRNA. Fettsyresyntesen blir dermed redusert. Ekspresjon av FAS reguleres via LXR både direkte og indirekte, indirekte via transkripsjonsfaktoren SREBP-1c og direkte via interaksjon av LXR med FAS-promotoren. I begge tilfellene oppreguleres fettsyresyntesen (27, 28).

- **CD36/FAT** (Fettsyretranslokase)

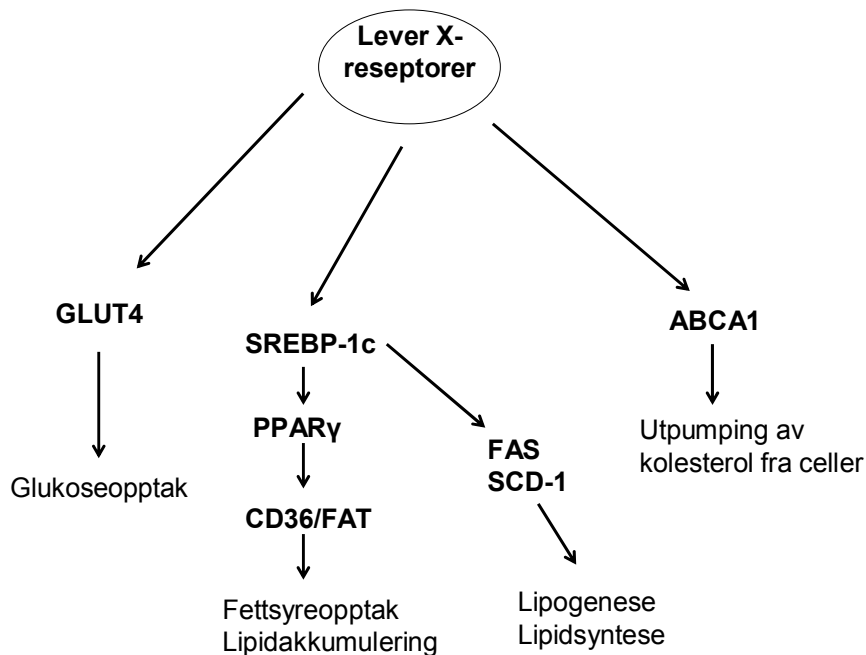
CD36/FAT er en transportør som transporterer lipider og fettsyrer, og fører til økt opptak av frie fettsyrer i muskel. CD36/FAT induseres av aktivering av PPAR γ (peroksisom proliferator-aktivert reseptor- γ) (29). At LXR regulerer CD36/FAT direkte er imidlertid ikke beskrevet. En indirekte effekt via SREBP-1c er sannsynlig, da SREBP-1c tidligere har vist å kunne oppregulere PPAR γ (30).

- **SCD-1** (Stearoyl-CoA desaturase-1)

SCD-1 er et enzym som katalyserer syntesen av mono-umettede fettsyrer. Uttrykket av genene for SCD-1 styres blant annet av transkripsjonsfaktoren SREBP-1c. LXR regulerer SCD-1 via SREBP-1c, og LXR-knockout mus har redusert ekspresjon av SCD-1-mRNA (27, 31).

- **GLUT4** (Glukosetransportør 4)

GLUT4 er en glukosetransportør som fjerner glukose fra blodet ved å transportere glukose inn i celler i målvev for oksidasjon eller lagring. Insulinstimulering fører til translokasjon av GLUT4 fra intracellulære lagringsvesikler til cellemembranen. Dette er en reversibel prosess. Aktivert LXR fører til økt transkripsjon av GLUT4 i fettvev, og dermed økt glukoseopptak. GLUT4-promotoren har vist seg å være direkte mål for LXR (25, 26).



Figur 1.4 Rollen til LXR i fettsyre-, kolesterol- og glukosemetabolisme i human skjelettmuskulatur.

SREBP-1c, sterol regulatorisk element-bindende protein-1c; FAS, fettsyresyntase; CD36/FAT, fettsyretranslokase; SCD-1, stearoyl-CoA desaturase-1; GLUT4, glukosetransportør 4; PPAR γ , peroksisom proliferator-aktivert reseptor- γ .

1.3 Hvorfor er muskel viktig?

Skjelettmuskulaturen utgjør omtrent 40% av kroppsvekten hos et menneske, og står for mer enn 30% av kroppens energiforbruk. Den er også hovedsete for opptak og oksidasjon av fettsyrer; fettsyreoksidasjon står for 70% av energibehovet til hvilende muskel. Denne prosentandelen øker ved vedvarende trening og ved sult.

Skjelettmuskulatur anses å være et potensielt viktig målvev for terapi ved sykdommer assosiert med unormal lipidmetabolisme, som for eksempel type 2-diabetes (20, 32).

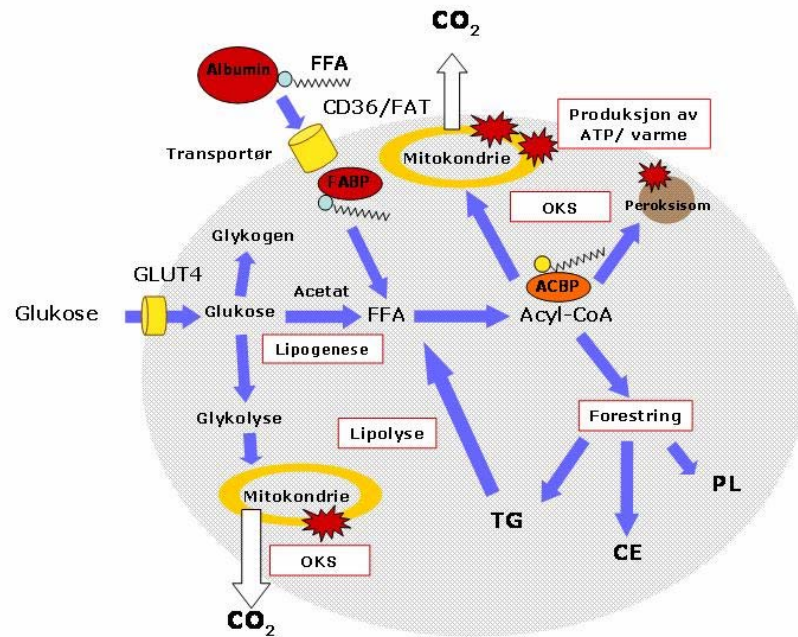
Skjelettmuskulaturen står også for hovedandelen av det insulinstimulerte glukoseopptaket (opptil 75%), og er dermed hovedsetet som påvirkes ved insulinresistens ved metabolske sykdommer som type 2-diabetes og fedme. Insulin øker glukoseopptak i muskel og fettvev via glukosetransportøren GLUT4, og hemmer glukoseproduksjonen i lever. Man anser skjelettmuskulatur for å være et interessant målorgan for eventuelle nye antidiabetiske legemidler (20, 32).

Rollen til LXR i muskel er imidlertid svært lite undersøkt.

1.4 Fett- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Frie fettsyrer (FFA) tas opp i celler hovedsakelig via transportør-proteiner i cellemembranen (for eksempel CD36/FAT) og transporteres intracellulært bundet til fettsyre-bindende proteiner (FABP). Frie fettsyrer aktiveres av acyl-CoA syntetaser til acyl-CoA før de transporteres via acyl-CoA-bindende protein (ACBP) til mitokondrier eller peroksisomer der de undergår β -oksidasjon (nedbrytning av acyl-CoA), og det dannes energi i form av ATP og varme. Fettsyrene kan også transporteres til endoplasmatisk retikulum for forestring til ulike typer lipider (triglyserider, kolesterylester, fosfolipider). Dette er lagringsformer av lipider i cellen (Figur 1.5). Acyl-CoA eller visse fettsyrer kan også bindes til transkripsjonsfaktorer (for eksempel LXR) som regulerer genuttrykk, alternativt kan de enten omdannes til signalmolekyler eller modifisere enzymer og proteiner direkte (Ikke vist på figuren).

Glukose kan omdannes til frie fettsyrer (lipogenese) dersom det er overskudd av glukose og energi i cellen. Alternativt kan glukose forbrennes i Krebs syklus i mitokondriene. GLUT4 finnes bare i skjelettmuskulatur, hjertemuskel og fettvev, og medierer økningen i glukosetransport som etterfølger insulinstimulering. Dette skjer ved at GLUT4 ved insulinstimulering translokeres fra intracellulære lagringsvesikler og til plasmamembranen, hvor den fungerer som en transportkanal for glukose inn i cellen (Figur 1.5).



Figur 1.5 Metabolisme av glukose og fett i skjelettmuskulatur. GLUT4, glukosetransportør; CD36/FAT, fettsyretransportør; FABP, fettsyre-bindende protein; FFA, fri fettsyre; ACBP, acyl-CoA-bindende protein; TG, triglyserid; CE, kolesterylester; PL, fosfolipid; OKS, oksidasjon.

1.5 Lever X-reseptorer i skjelettmuskel

Lever X-reseptorene er vist å være viktige regulatorer av metabolismen av kolesterol og lipider, og er også involvert i glukosemetabolisme. Rollen til LXR i metabolismen er hovedsakelig studert i lever og fettvev, men det er blitt vist at LXR også er involvert i metabolismen i skjelettmuskulatur (20).

Det er vist at aktivering av LXR ved hjelp av den syntetiske agonisten T0901317 øker opptak og distribusjon av fettsyrer i tillegg til opptak og oksidasjon av glukose i humane skjelettmuskler i kultur (33). Aktivering av LXR øker også revers kolesteroltransport, ut fra celler og til bærermolekyler som for eksempel HDL (20). Det er også vist at aktivering av LXR induserer ekspresjon av viktige gener for metabolisme av kolesterol og lipider i humane skjelettmuskelceller, blant annet CD36/FAT, FAS, SCD-1, ABCA1 og SREBP-1c. Glukosetransportøren GLUT4 oppreguleres også (20, 25, 33)

Det er imidlertid ikke gjort veldig mange studier på den funksjonelle rollen til LXR i muskelceller. Dette er et felt som det vil være nyttig å forske mer på, spesielt med tanke på utvikling av nye legemidler til bruk ved behandling av tilstander der metabolske forstyrrelser spiller inn, som for eksempel type 2-diabetes.

1.6 LXR-ligandene brukt i oppgaven

I likhet med mange andre kjernereseptorer ble lever X-reseptorene opprinnelig klassifisert som "foreldreløse" (orphan) reseptorer, fordi de naturlige ligandene ikke var kjent på det tidspunktet reseptorene ble klonet. LXR bindes og aktiveres av syntetiske LXR-ligander (for eksempel T0901317) (21). Det finnes også naturlig forekommende ligander til LXR. Oksygenerte kolesterolderivater (oksysteroler) er ligander for både LXR α og LXR β . Eksempler på slike oksysteroler er 24(S),25-epoksykolesterol som finnes i lever (34), 22-R-hydroksykolesterol som finnes i binyrene (35), 24-S-hydroksykolesterol, også kjent som cerebrosterol da den dannes i nevroner i hjernen (36) og 27-hydroksykolesterol som finnes i plasma, lever og makrofager (37).

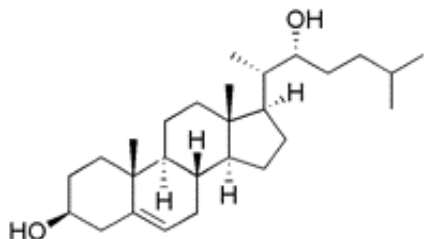
Siden de naturlige ligandene ble identifisert, har det blitt utført mange studier på sammenhengen mellom ligandenes struktur og aktivitet. Slik har man kunnet lage syntetiske LXR-ligander som den ikke-steroide liganden T0901317 som aktiverer både LXR α og LXR β . Selektive ligander for LXR α og LXR β er også beskrevet (38).

I forsøkene i denne oppgaven er det brukt et utvalg av LXR-ligander, både naturlige og syntetiske.

Naturlig forekommende hydroksykolesteroler:

- **22-R-hydroksykolesterol (22-R-HC)**

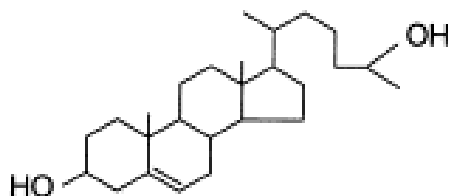
22-R-hydroksykolesterol dannes som forbigående intermediat ved syntesen av steroidhormoner, distribusjonen er derfor begrenset. 22-R-HC er vist å være en potent aktivator av LXR i CV-1-celler fra apenyre (35).



Figur 1.6 22-R-hydroksykolesterol. Bilde fra referanse (39).

- **27-hydroksykolesterol (27-HC)**

27-hydroksykolesterol dannes i lever ved hydroksylering av kolesterol via sterol-27-hydroksylase, men er *ikke* et intermediat i syntesen av kolesterol. 27-HC er den av de ulike hydroksykolesterolene som finnes i størst mengde i plasma hos mennesker, og den finnes også i lever og makrofager (37).

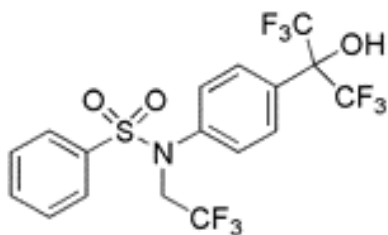


Figur 1.7 27-hydroksykolesterol. Bilde fra referanse (36).

Syntetiske ligander:

- **T0901317**

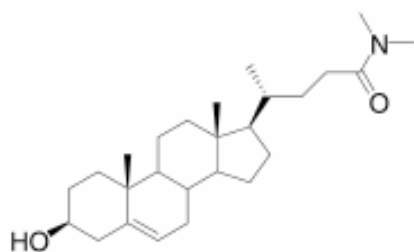
T0901317 er en ikke-steroid, potent LXR-agonist. Den virker på både LXR α og LXR β (21). T0901317 er også vist å være en aktivator av en annen kjernereseptor; FXR (farnesoid X-reseptor) (40).



Figur 1.8 T0901317. Bilde fra referanse (39).

- **DMHCA** (N,N-dimetyl-3 β -hydroksyl-cholenamid)

DMHCA er en genselektiv LXR-agonist som aktiverer transkripsjonen av ABCA1 i tynntarm, lever og makrofager samtidig som den har mindre effekt på transkripsjonen SREBP-1c i lever (41).



N,N-Dimethyl-3 β -hydroxy-
cholenamide (DMHCA)

Figur 1.9 N,N-dimetyl-3 β -hydroksyl-cholenamid (DMHCA). Bilde fra referanse (41).

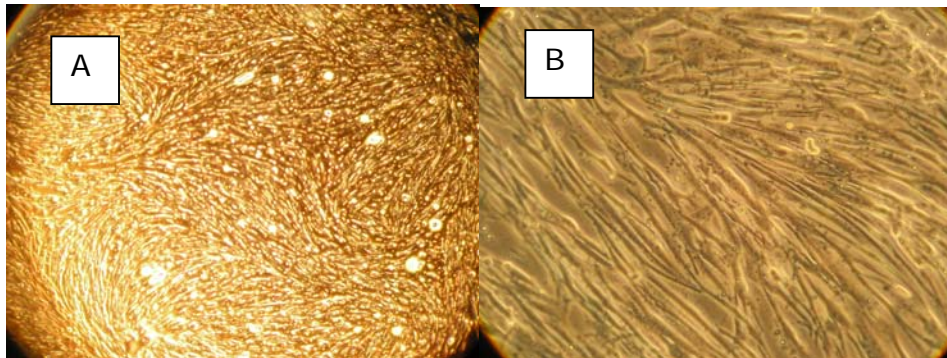
- **22-S-hydroksykolesterol (22-S-HC)**

Tidligere ble det antatt at S-isomeren av 22-hydroksykolesterol var en inaktiv LXR-ligand (42). Senere er det vist at 22-S-HC ikke er inaktiv, men virker som en LXR-antagonist eller en invers agonist (34). Det er vist at behandling med 22-S-HC fører til redusert syntese av komplekse lipider som DAG og TAG og undertrykking av bestemte gener involvert i lipogenese og lipidomsetning som CD36/FAT og FAS (43). Dette er forenelig med hypotesen om at 22-S-HC er en LXR-antagonist. Strukturen til 22-S-HC er identisk med den til 22-R-HC bortsett fra at konfigurasjonen rundt det stereogene senteret er S, ikke R.

1.7 Humane skjelettmuskelceller

Humane skjelettmuskelceller i kultur er en modell for å studere metabolisme i muskel. Denne metoden er blant annet blitt brukt til å studere effekten av forbehandling med fettsyrer og kronisk behandling med høye doser glukose på fettsyre- og glukosemetabolismen (44).

Forsøkene i denne oppgaven er gjort på skjelettmuskelceller fra donorer med normal BMI og normale fastende glukoseverdier.



Figur 1.10 Bilder av muskelceller i mikroskop. Bildene er tatt ved forsøk med multiwell-metoden, der cellene dyrkes på 96-brønners brett.

- A) Bilde tatt etter utført forsøk, etter 2 ganger vask med PBS (x 10 forstørrelse).
- B) Samme motiv ved større forstørrelse (x 20 forstørrelse).

1.8 Multiwell-metoden

1.8.1 Bakgrunn for utvikling av metoden

Å måle opptak og etterfølgende oksidasjon av radiomerkede substrater som fettsyrer og glukose ved forsøk på celler har hovedsaklig vært basert på de samme prinsippene i mange år. Cellene har tradisjonelt blitt dyrket på 6- eller 12-brønners celleplater i nærvær av de interessante substratene og etter en viss tid har cellene blitt høstet og prosessert for telling og ulike kjemiske analyser. Denne arbeidsmetoden er både tids- og ressurskrevende, og det er betydelig behov for mer effektive og mindre kostbare metoder der flere resultater kan oppnås på kortere tid og ved hjelp av mindre ressursbruk for disse typene målinger.

1.8.2 Litt om metoden

To ulike metoder er hittil utviklet for å utføre metabolismestudier ved hjelp av multiwell-metoden. Begge metodene er svært effektive da cellene dyrkes på 96-brønners celleplater, og man får ut en stor mengde resultater på kort tid sammenlignet med andre metoder som ble brukt tidligere.

De to metodene er:

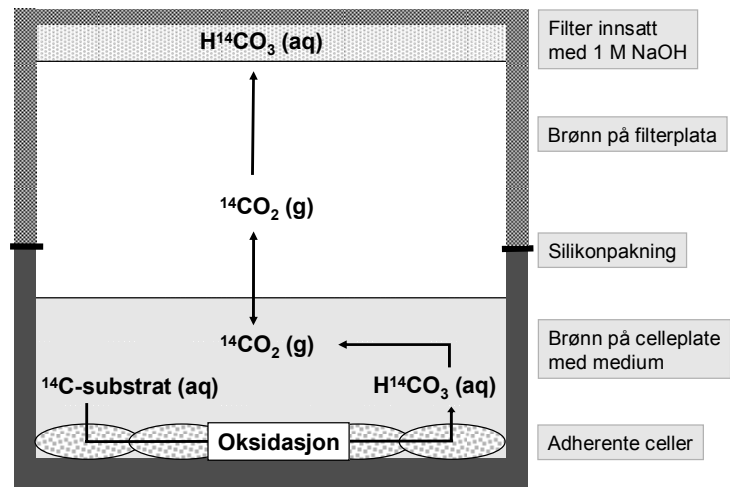
- a) Substrat-oksidasjons forsøk i 96-brønners format.
- b) SPA-forsøk (Scintillation proximity assay) (Kapittel 1.8.4).

1.8.3 Substrat-oksidasjons forsøk i 96-brønners format

Denne metoden er brukt for å måle oksidasjon av radiomerkede substrater i forsøkene utført i denne oppgaven. Oksidasjonen kvantifiseres ved å måle mengden $^{14}\text{CO}_2$ produsert fra radiomerkede substrater under forsøket.

Celler dyrkes på 96-brønners celleplater og preinkuberes med substanser som tilsettes direkte til differensieringsmediet. Oksidasjon av ulike substrater kan måles ved å inkubere cellene med ^{14}C -merkede substrater; ^{14}C -fettsyrer eller ^{14}C -glukose. En glassfiber-filterplate aktiveres for opptak av CO_2 ved å sette den inn med 1 M NaOH. Celleplata og filterplata som skal ta opp CO_2 legges sammen under press med en silikonpakning i mellom som beskrevet på figuren under (celleplata ligger nederst, så silikonpakningen og filterplata på toppen). Press blir lagt på systemet ved hjelp av en spesialkonstruert platepresse beskrevet i neste avsnitt. Deretter blir platene plassert i en inkubator ved 37°C , og oksidasjonen går i en viss tid, vanligvis 2-4 timer. CO_2 fanges opp kontinuerlig i filterplata innsatt med NaOH.

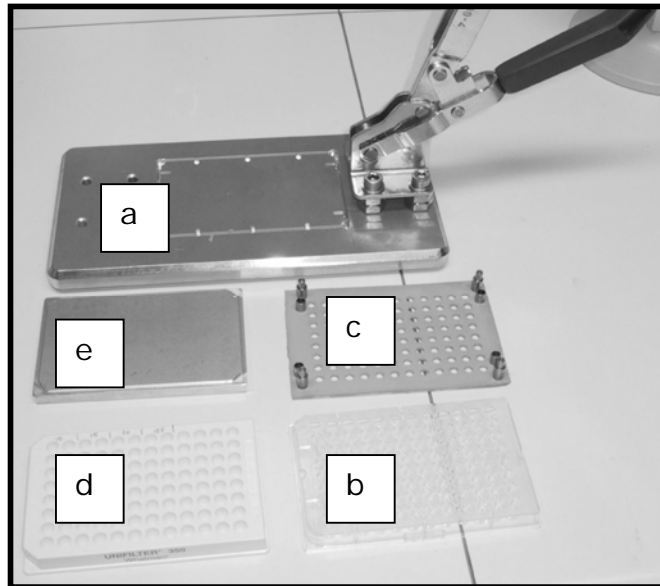
Inkuberingen avbrytes på ønsket tidspunkt og mengden CO_2 fanget opp i filterplata kan måles ved tilsetning av 50 μl scintillasjonsvæske til hver brønn. Mengden radioaktivitet akkumulert i cellene kan måles ved hjelp av en scintillasjonsteller for mikrotiterplater.



Figur 1.11 Skjematisk framstilling av metoden for måling av substrat-oksidasjon (aq=vannfase, g=gassfase). Figuren er laget av Arild Chr. Rustan.

1.8.4 Platepressa

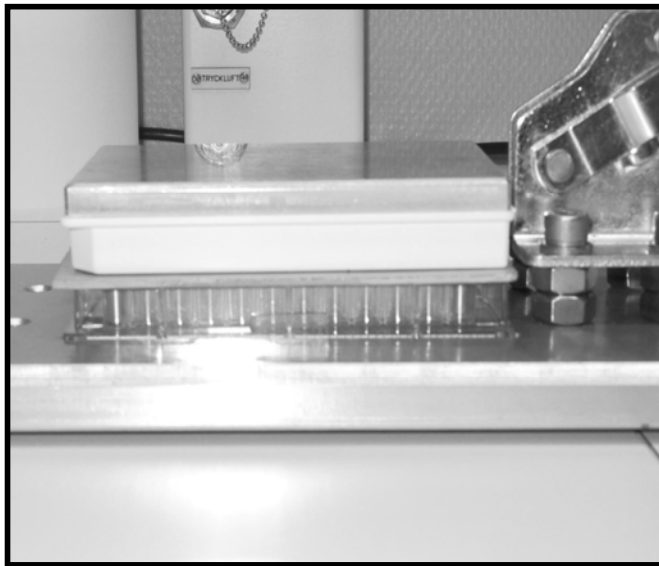
Platepressa er utviklet for å legge jevnt press på platene ved inkubering. Dette er viktig for at systemet skal være tett, noe som igjen er viktig for oppsamlingen av den produserte CO_2 fra hver enkelt brønn på celleplata.



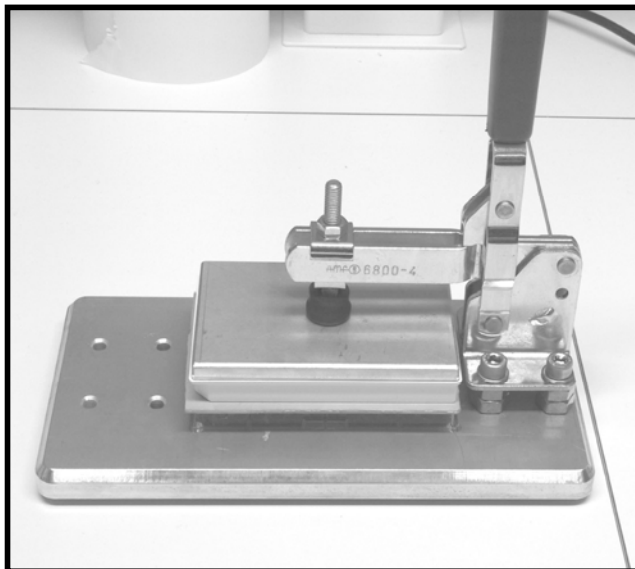
Figur 1.12 Utstyret som trengs for forsøk med multiwell-metoden.

- a) Selve platepressa.
- b) 96-brønners plate til dyrking av celler.
- c) Silikonpakning med stabiliserende knotter til hver av hjørne-brønnene.
- d) 96-brønners glassfiber filterplate.
- e) Metallplate for å legge jevnt press på platene.

Bildet er tatt av Stefan Hallén, Astra Zeneca.



Figur 1.13 Rekkefølgen de ulike delene har når de presses sammen. Celleplata nederst, deretter silikonpakningen, filterplata og metallplata øverst. Bildet er tatt av Stefan Hallén, Astra Zeneca.

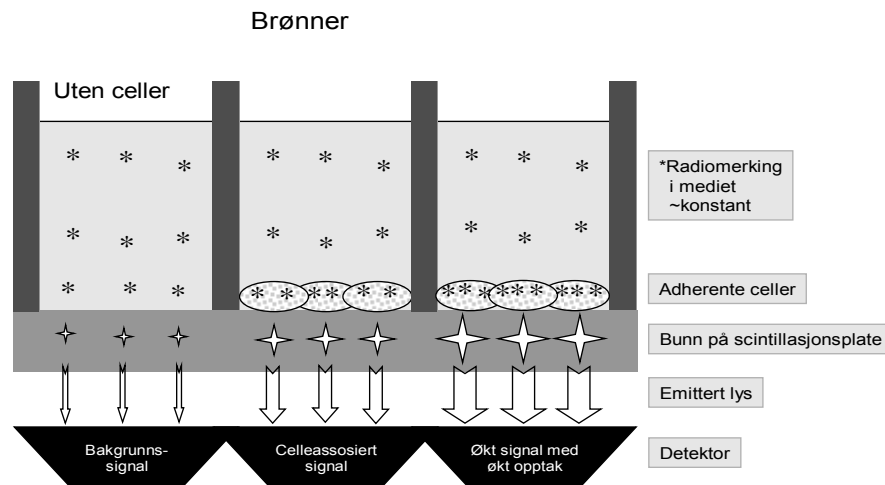


Figur 1.14 Håndtaket på platepressa låses til slutt over metallplata, slik at alle platene presses sammen. Bildet er tatt av Stefan Hallén, Astra Zeneca.

1.8.5 SPA-forsøk (Scintillation proximity assay)

Akkumulering av radioaktivt merkede substrater kan måles ved ulike tidspunkter ved hjelp av denne metoden. Radiomerkede substrater tatt opp og akkumulert av de voksende cellene vil konsentreres nært scintillasjonsvæsken som er inkorporert i plata som cellene dyrkes på, og det dannes dermed et sterkere signal ved nedbrytning av denne radioaktiviteten enn fra radioaktiviteten som befinner seg ute i mediet (Fig 1.15). Man kan måle både transport av radioaktivitet inn i cellene (økt intensitet av signalet) og transport av radioaktivitet ut av cellene (redusert intensitet av signalet).

Metoden kan brukes til å måle for eksempel akkumulering av celleassosierte ^{14}C -fettsyrer i humane fettceller og muskelceller i kultur, og akkumulering av celleassosiert ^{14}C -deoksyglukose i humane muskelceller. Dette er en ikke-invasiv metode, og cellene trenger ikke høstes og prosesseres før radioaktiviteten måles. Metoden kan brukes på alle celletyper som kan dyrkes på celleplater, men forutsetter bruk av stoffer radiomerket med β -emitterende isotoper som ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I eller ^3H .



Figur 1.15 Skjematisk framstilling av SPA-metoden. Cellene dyrkes på spesielle SPA-plater med scintillasjonsvæske inkorporert i selve plata. Figuren er laget av Andreas J. Wensaas.

1.9 Mål for oppgaven

Kjernereseptorene LXR aktiveres av kolesterolderivater (oksysteroler) og av syntetiske ligander som T0901317. Studier der det er brukt endogene eller syntetiske ligander for å aktivere disse reseptorene har vist at de er viktige i reguleringen av lipid- og glukosehomeostasen. LXR-ligander undersøkes nå som potensielle terapeutiske agens for behandling av tilstander med forstyrret lipid- og karbohydratmetabolisme, for eksempel type 2-diabetes. Skjelettmuskel spiller en viktig rolle i lipid- og glukosehomeostasen, og det er nyttig å fortsette å undersøke effekten av ulike LXR-modulerende substanser i humane skjelettmuskelceller.

Konkrete mål:

- Utprøving og optimalisering av multiwell-metoden for metabolismestudier.
- Etter optimalisering vil metoden brukes til måling av opptak og oksidasjon av radiomerkede substrater som fettsyre og glukose.
- Undersøke effekt av ulike LXR-ligander på fettsyre- og glukosemetabolisme.
- Undersøke evnen glukose har til å påvirke lipidmetabolisme.
- Sammenligne fettsyremetabolisme etter kronisk og akutt forbehandling med fettsyre.
- Teste ut FAS-hemmeren cerulenin for effekter på fettsyremetabolisme. Det vil bli undersøkt om cerulenin kan motvirke den lipogene effekten av LXR-agonisten T0901317.

2. Materialer og metoder

2.1 Materialer

DMEM med GLUTAMAX-1 (DMEM-GLUTAMAX), L-glutamin, FCS, fungizone 250 mg/ml og penicillin-streptomycin 10 000 U/ml-10 000 mg/ml ble kjøpt fra Gibco, Paisley, UK. Ultrosor G ble kjøpt fra BioSeptra, Process Division of Ciphergen Biosystems Inc., Paris, Frankrike. Bovint serum albumin (BSA) (fettsyrefri), L-karnitin, cerulenin, dimetylsulfoksid (DMSO), N-[2-hydroksyetyl]piperazin-N'-[2-etansulfonsyre] (HEPES), palmitinsyre (PA), oljesyre (OA), 22-S-hydroksykolesterol (22-S-HC) og 22-R-hydroksykolesterol (22-R-HC) ble kjøpt fra Sigma Chem Co, St. Louis, MO, USA. T0901317 ble skaffet fra Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA. 27-hydroksykolesterol (27-HC) ble kjøpt fra Research Plus Inc., Manasquan, NJ, USA (www.researchplus.com). N,N-dimetyl-3 β -hydroksyl-choleamid (DMHCA) var en gave fra Elaine M. Quinet, Department of Cardiovascular/ Metabolic Diseases, Wyeth Research, Collegeville, USA. Dulbecco's phosphate buffered saline m/ Ca²⁺ og Mg²⁺ (DPBS) ble kjøpt fra Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, USA. (1-¹⁴C)palmitinsyre (PA) (53 mCi/mmol), (1-¹⁴C)oljesyre (OA) (55 mCi/mmol), D-(1-¹⁴C)glukose (55 mCi/mmol), D-(U-¹⁴C)glukose (5 mCi/mmol) og D-(6-¹⁴C)glukose (55 mCi/mmol) ble kjøpt fra American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA. 96-brønners prøveplater Isoplate™ ble kjøpt fra Wallac OY, Turku, Finland. Insulin Actrapid® ble kjøpt fra Novo Nordisk, Bangsværd, Danmark. Proteinmålings-sett ble kjøpt fra Bio-Rad, København, Danmark. Cell-Bind® celledyrkingsplater ble kjøpt fra Corning Inc., Costar, NY, USA. 96-brønners filterplater Whatman UniFilter®- 96 GF/B®, TopSeal®-A klebende film og scintillasjonsvæskene UltimaGold™ og OptiPhase Supermix® ble kjøpt fra PerkinElmer Life and Analytical Science, Boston, MA, USA. Scintillasjonsvæsken Ecoscint™A ble kjøpt fra Laborel, Oslo, Norge.

Det øvrige utstyret som ble benyttet var av høy kvalitet og analytisk renhetsgrad.

2.2 Metoder

De humane muskelcellene brukt i disse forsøkene ble dyrket i henhold til prosedyren beskrevet av Gaster et al (45).

2.2.1 Utsåing av satelittceller

Fryserør med satelittceller fra ulike donorer ble lagret nedfrost i en tank med flytende nitrogen. Etter at rørene ble tatt ut, ble de tint raskt i temperert vann. Cellene ble så overført til et 50 ml sentrifugerør og 5 ml utsåingsmedium (M1-medium) ble tilsatt cellesuspensjonen dråpevis og deretter blandet forsiktig. Cellene ble så sentrifugert ved 1800 rpm i 5 minutter, og supernatanten inneholdende toksisk DMSO, som bevarer cellene ved nedfrysing, ble fjernet. Cellepelletten ble resuspendert i 1 ml utsåingsmedium og blandet godt med pipette. Denne cellesuspensjonen ble deretter tilsatt passende mengde utsåingsmedium. Cellene ble blandet forsiktig og sådd ut på 96-brønners brett med 8-kanals pipette, 100 µl cellesuspensjon per brønn. Dette tilsvarte en celletetthet på ca. 6000 celler per brønn.

2.2.2 Vekst av satelittceller og differensiering til muskelceller

Etter utsåing ble cellene inkubert i omtrent 24 timer. M1-medium ble byttet til proliferasjonsmedium (M2-medium) 100 µl per brønn, og cellene ble inkubert i 2 dager til før ytterligere 50 µl M2-medium ble tilsatt i hver brønn. Dette i stedet for å bytte medium, for å forstyrre cellene minst mulig i sin vekst. Etter ytterligere 1 dag hadde cellene nådd omtrent 70-80 % konfluens. Ved å bytte medium fra M2-medium til differensieringsmedium (M3-medium) på dette tidspunktet, begynte cellene å differensiere til multinukleære muskelfibre (myotuber). Dette mediet ble byttet hver 2.-3. dag, og forsøk ble utført 7 dager etter start av differensieringen. Ulike substanser ble tilsatt M3-mediet i henhold til forsøkene som skulle utføres, og de ble alltid tilsatt de siste 4 dager forut for forsøket, bortsett fra i forsøkene der det ble brukt cerulenin. Cerulenin ble tilsatt 1 eller 4 døgn forut for forsøket, da effekten på cellene ikke var kjent på forhånd. I alle forsøkene ble det brukt 4 brønner per behandling.

Cellene ble visuelt undersøkt i mikroskop gjennom vekst og differensiering, og enkelte ganger ble det også tatt bilder av cellene for å dokumentere utseende og vekst.

2.2.3 Donorkarakteristika

Muskelcellene som ble brukt kom fra muskelbiopsier fra *M. transversus abdominis* fra 3 friske frivillige forsøkspersoner (2 menn, 1 kvinne), alder 35 år (± 1 år), med BMI 22.7 (± 3.3) og fastende blodglukose innenfor normalverdier (5.0 mmol/l ± 0.1).

2.2.4 Måling av celleassosiert glukose

I forsøkene i denne oppgaven ble celleassosiert glukose brukt som et mål på cellenes glukoseopptak. Når opptak omtales i denne oppgaven, er det målt som celleassosiert radioaktivitet etter utført forsøk. I realiteten måler man ved denne metoden ikke det totale opptaket av [^{14}C]glukose, men hvor mye radioaktivitet cellene inneholder etter at forsøket er utført. Man må ta høyde for at opptaket egentlig er høyere, fordi en del av [^{14}C]glukose er oksidert til [^{14}C]CO₂ i Krebs syklus i mitokondriet i tillegg til laktatdannelse ved anaerob metabolisme i cytosol.

Differensieringsmedium ble byttet til forsøksmedium bestående av DPBS tilsatt 10 mM HEPES-buffer (pH 7.3) og en av de tre ulike glukoseisotopene som ble brukt:

- [$1\text{-}^{14}\text{C}$]glukose (100 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$).
Denne isotopen har radioaktiv merking på karbon nummer 1.
- [$\text{U-}^{14}\text{C}$]glukose (100 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$).
Denne isotopen har radioaktiv merking på alle karbonatomene.
- [$6\text{-}^{14}\text{C}$]glukose (100 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$).
Denne isotopen har radioaktiv merking på karbon nummer 6.

I noen av forsøkene ble det sammenlignet glukoseopptak med og uten insulin. Forsøksmediet ble da tilsatt 100 nM insulin. Forsøksmediet, som holdt 37°C ble tilsatt nøyaktig 50 μl per brønn. Platene ble deretter plassert i platepressa som ble inkubert

ved 37°C i 4 timer. Etter inkubering ble platene plassert på is. Forsøksmediet ble fjernet, og cellene ble vasket 2 ganger med iskald høstebuffer (PBS- buffer, pH 7.4), 150 µl per brønn. Deretter ble det tilsatt 200 µl 0.05 mol/l NaOH til hver brønn. Platene ble plassert i romtemperatur i minst 30 minutter, slik at cellene skulle bli løst opp i NaOH. Eventuelt ble platene frosset ned til -20°C. Lysatet ble homogenisert ved ultralyd-sonikering, 2-3 sekunder per brønn. Dette ble kuttet ut etter hvert, da det ble vurdert å være unødvendig (visuell inspeksjon viste at cellene løste seg opp også uten sonikering). Deretter ble radioaktiviteten i prøvene telt ved hjelp av en β -scintillasjonsteller.

2 ulike metoder ble brukt til telling av radioaktivitet i disse forsøkene:

- 125 µl lysat fra hver brønn ble overført til tellerør og tilsatt 2,5 ml UltimaGold™ eller Ecoscint™A tellevæske. Radioaktiviteten i prøvene ble telt ved hjelp av en β -scintillasjonsteller (Tri-Carb®) fra Packard Instruments Corp.
- 100 µl lysat fra hver brønn ble overført til 96-brønners brett og tilsatt 200 µl OptiPhase Supermix® tellevæske. Radioaktiviteten i prøvene ble telt ved hjelp av en β -scintillasjonsteller (1450 Microbeta PLUS®) fra Wallac.

2.2.5 Måling av glukoseoksidasjon (karbondioksid)

Glukosen som blir tatt opp i cellene undergår metabolisme til CO₂ i mitokondriene (Krebs syklus) i tillegg til omdannelse til pyruvat i glykolysen i cytosol. Mengden [¹⁴C]glukose som tas opp og metaboliseres av cellene er direkte relatert til mengden [¹⁴C]CO₂ produsert. Dermed er det mulig å måle glukoseoksidasjonen i cellene ved å fange opp og telle [¹⁴C]CO₂ som dannes.

En 96-brønners filterplate ble innsatt med 1 mol/l NaOH, 50 µl per brønn. Denne plata ble plassert oppå celleplata etter at forsøksmediet var tilsatt, med en 96-hulls silikonpakning i mellom slik at det ble helt tett. Etter 4 timers inkubering ble filterplata tatt av og tilsatt 50 µl OptiPhase Supermix® tellevæske i hver brønn. Radioaktiviteten i brønnene ble telt ved hjelp av en β -scintillasjonsteller (1450 Microbeta PLUS®).

2.2.6 Måling av celleassosiert fettsyre

I forsøkene i denne oppgaven ble celleassosiert fettsyre brukt som et mål på cellenes fettsyreopptak. Se for øvrig kommentar under kapittel 2.2.4.

Differensieringsmedium ble byttet til forsøksmedium bestående av DPBS tilsatt 10 mM HEPES-buffer (pH 7.3), 7.27 $\mu\text{mol/l}$ BSA, 1.0 mmol/l L-karnitin, samt radioaktivt merket fettsyre avhengig av typen forsøk. Følgende isotoper og konsentrasjoner ble brukt i forsøkene i denne oppgaven:

- Forsøk med lave konsentrasjoner av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitinsyre (PA) (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 23 $\mu\text{mol/l}$) og [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (OA) (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 18.5 $\mu\text{mol/l}$) ble brukt som en del av metodeutprøvingen.
- I noen av forsøkene ble det gjort en sammenligning av kronisk (24 timer) og akutt (4 timer) behandling med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA. Cellene som ble kronisk behandlet ble behandlet med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 20 $\mu\text{mol/l}$) i 24 timer, samtidig som cellene som skulle behandles akutt ble tilsatt samme konsentrasjon av umerket OA. Cellene som ble akutt behandlet med OA ble så tilsatt [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) i 4 timer, samtidig som cellene som ble kronisk behandlet da ble tilsatt samme konsentrasjon av umerket OA. Grunnen til at umerket OA ble tilsatt var at forholdene for cellene skulle være mest mulig like.
- [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA i de øvrige forsøkene (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 $\mu\text{mol/l}$).
- Ved forsøk med dose/respons av OA med og uten glukose i forsøksmediet ble følgende konsentrasjoner av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA brukt: 20 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$ og 300 $\mu\text{mol/l}$.

I noen av forsøkene ble det sammenlignet fettsyreopptak og -oksidasjon med og uten glukose, forsøksmediet ble da tilsatt 5.0 eller 5.5 mmol/l glukose.

Forsøksmediet som holdt 37°C ble tilsatt nøyaktig 50 μl per brønn. Platene ble deretter plassert i platepressa som ble inkubert ved 37°C i 4 timer. Etter inkubering ble platene plassert på is. 30 μl forsøksmedium fra hver brønn ble tatt ut og over i nye rør for måling av syreløselige metabolitter (ASM). Resten av forsøksmediet ble fjernet, og cellene ble vasket 2 ganger med iskald høstebuffer (PBS-buffer, pH 7.4),

150 µl per brønn. Deretter ble det tilsatt 200 µl 0.05 mol/l NaOH til hver brønn. Platene ble plassert i romtemperatur i minst 30 minutter, slik at cellene skulle bli løst opp i NaOH. Eventuelt ble platene frosset ned til -20°C. Lysatet ble homogenisert ved ultralyd-sonikering, 2-3 sekunder per brønn. Dette ble kuttet ut etter hvert, da det ble vurdert å være unødvendig (visuell inspeksjon viste at cellene løste seg opp også uten sonikering). Deretter ble radioaktiviteten i prøvene telt ved hjelp av en β -scintillasjonsteller.

2 ulike metoder ble brukt til telling av radioaktivitet i disse forsøkene, metodene er de samme som nevnt under kapittel 2.2.4 (måling av celleassosiert glukose).

2.2.7 Måling av fettsyreoksidasjon

A) Syreløselige metabolitter (ASM)

Differensieringsmedium ble byttet til forsøksmedium bestående av DPBS tilsatt 10 mM HEPES-buffer (pH 7.3), 7.27 µmol/l BSA, 1.0 mmol/l L-karnitin, samt radioaktivt merket fettsyre avhengig av typen forsøk. Muskelcellene ble eksponert for forsøksmediet i 4 timer for å studere fettsyreoksidasjon. I forsøkene der det ble gjort en sammenligning av kronisk og akutt behandling med fettsyre, ble i tillegg en del av cellene behandlet med radioaktiv fettsyre i 24 timer. Etter avsluttet forsøk ble 30 µl forsøksmedium fra hver brønn tatt ut for analyse av syreløselige metabolitter. Syreløselige metabolitter gir et estimat av β -oksidasjon av fettsyrer.

B) Karbondioksid (CO₂)

En 96-brønners filterplate ble innsatt med 1 mol/l NaOH, 50 µl per brønn. Denne plata ble plassert oppå celleplata etter at forsøksmediet var tilsatt, med en 96-hulls silikonpakning i mellom slik at det ble helt tett. Etter 4 timers inkubering ble filterplata tatt av og tilsatt 50 µl OptiPhase Supermix® tellevæske i hver brønn. Radioaktiviteten i brønnene ble telt ved hjelp av en β -scintillasjonsteller (1450 Microbeta PLUS®).

2.2.8 Analyse av syreløselige metabolitter (ASM)

Syreløselige metabolitter gir et estimat av β -oksidasjon av fettsyrer.

Etter avsluttet forsøk ble 30 μ l forsøksmedium fra hver brønn tatt ut til ett lite plastrør per behandling. Fra dette røret ble 2×50 μ l tatt ut i nye rør til felling. Disse rørene ble plassert på is. 50 μ l iskald BSA (6% w/w) ble tilsatt hvert rør, etterfulgt av 400 μ l iskald PCA (1 mol/l) for å få felt ut BSA-fettsyre kompleksene. På samme måte ble 2×50 μ l av forsøksmediet også felt, for måling av bakgrunnsaktivitet som ble trukket fra de målte verdiene. Hvert av rørene ble plassert i en sentrifuge som holdt 4°C og 14 000 rpm i 10 minutter. Etter sentrifugering ble 250 μ l av supernatanten tatt ut i tellerør og tilsatt 2,5 ml UltimaGold™ eller Ecoscint™A tellekæbe. Radioaktiviteten i prøvene ble telt ved hjelp av en β -scintillasjonsteller, og mengden ASM produsert etter inkubering ble kvantifisert

2.2.9 Analyse av cellulært protein

50 μ l prøve fra hver brønn samt 2×50 μ l av proteinstandarder ble overført til en 96-brønners mikrotiterplate. Proteinstandardene ble laget fra BSA og fortynnet i 0.05 mol/l NaOH til kjent konsentrasjon. Hver brønn ble tilsatt 200 μ l standard proteinfargningsreagens, fortynnet fra 1 del fargekonsentrat (Bio-Rad) i 4 deler destillert vann. Prøvene sto ved romtemperatur i 5 minutter før absorbansen ved 595 nm ble målt med Victor mikroplateleser (Perkin Elmer). Utregning av totalt proteininnhold i hver brønn ble gjort ved hjelp en standardkurve. Måleresultatene ble oppgitt i μ g protein/ml.

2.2.10 Statistisk analyse

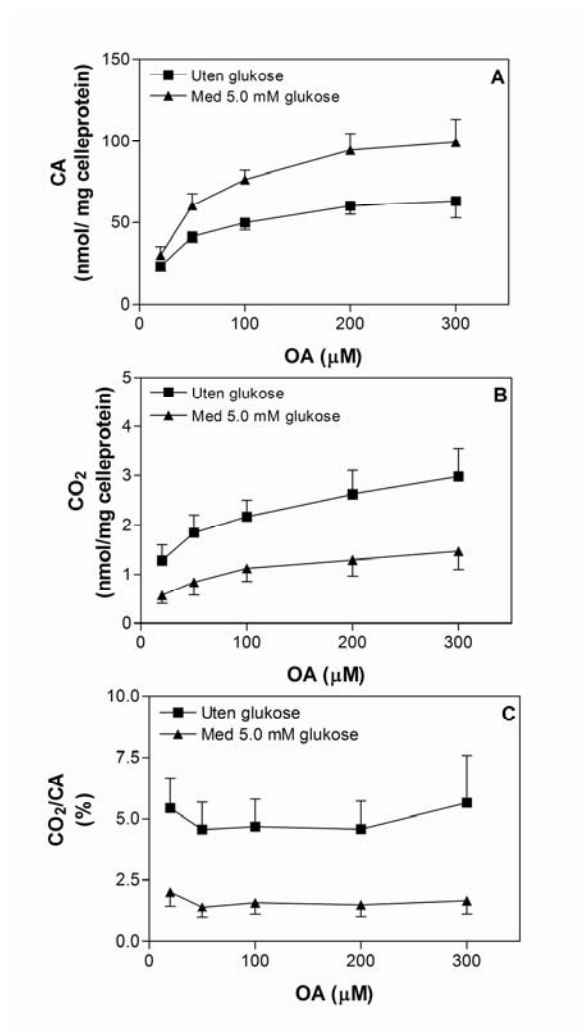
For alle forsøkene ble middelerverdier regnet ut fra fire paralleller for hver behandling. Data i oppgaveteksten og figurene er gitt som middelerverdi \pm SEM eller omregnet til % av kontroll \pm SEM.

Sammenligning av samme behandlinger for ulike donorer ble evaluert ved en Student t-test for to parvise utvalg med en tosidig fordeling. Statistisk analyse ble utført på forsøk som inneholdt minst 3 ulike donorer og $p < 0.05$ ble ansett som statistisk signifikant.

3. Resultater

3.1 Forsøk med oljesyre (OA)

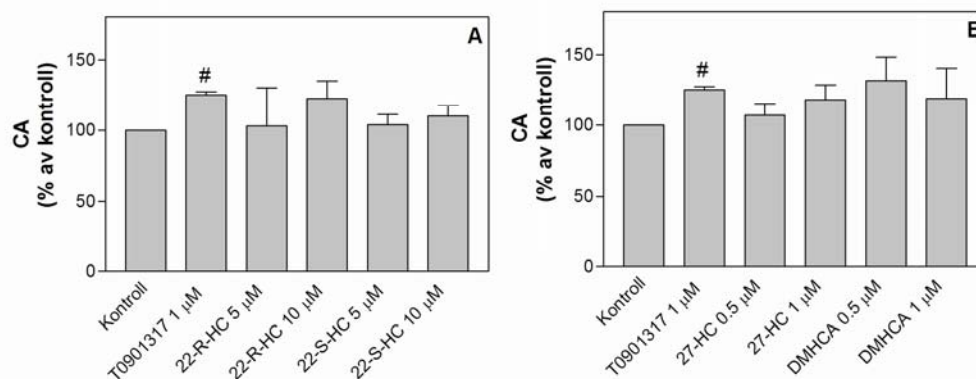
3.1.1 Glukose påvirker metabolismen av OA



Figur 3.1 Celleassosiert (CA) oljesyre (OA) (A), oksidasjon av OA til CO₂ (B) og forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA (C) etter inkubering med varierende konsentrasjoner av [1-¹⁴C]OA i 4 timer, med eller uten 5.0 mM glukose i forsøksmediet (DPBS tilsatt 10 mmol/l HEPES). Resultatene representerer gjennomsnitt \pm SEM (n=5). $p < 0.05$ mot kontroll uten glukose (0.1% DMSO). Alle resultatene er signifikante i dette eksperimentet.

OA-opptaket økte med gjennomsnittlig 50% sammenlignet med kontrollen da 5.0 mM glukose ble tilsatt forsøksmediet (Fig. 3.1 A). Både med og uten glukose var det en doseavhengig effekt av OA på opptaket. Oksidasjonen av OA til CO₂ ble betydelig redusert da cellene ble behandlet med forsøksmedium tilsatt glukose, den gjennomsnittlige reduksjonen var på 44% sammenlignet med kontrollen (Fig. 3.1 B). Også her var det en doseavhengig effekt av OA, både med og uten glukose. Ratioen CO₂/CA ble redusert ved tilsetning av glukose til forsøksmediet, med gjennomsnittlig 32% sammenlignet med kontrollen (Fig. 3.1 C). Ved tilsetning av glukose til forsøksmediet ble altså mer OA lagret i forhold til det som ble oksidert, og nettoeffekten ble lagring av lipider i cellene.

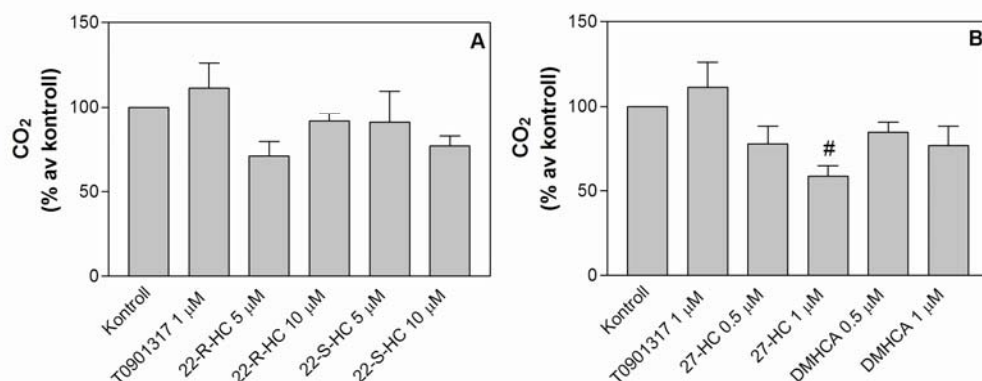
3.1.2 OA-metabolisme- ulike LXR-ligander



Figur 3.2 Celleassosiert (CA) oljesyre (OA) etter forbehandling med substansene indikert på x-aksen de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 μCi/ml, 100 μmol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt ± SEM (n=3). #p < 0.05 mot kontroll (0.1% DMSO). 22-R-HC, 22-R-hydroksykolesterol; 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol; 27-HC, 27-hydroksykolesterol; DMHCA, N,N-dimetyl-3β-hydroksyl-choleamid.

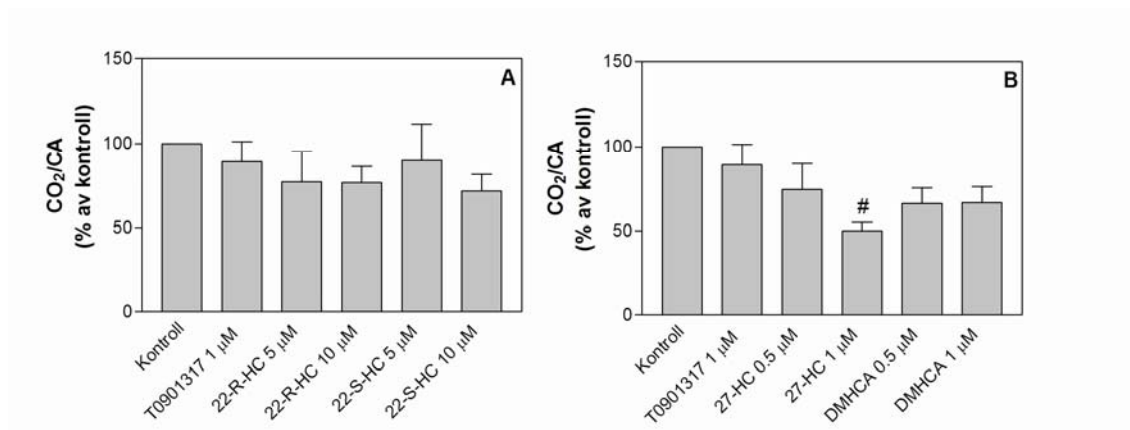
Opptak av OA økte signifikant etter behandling med T0901317 i 4 dager. Økningen var på gjennomsnittlig 25% sammenlignet med kontrollen. Behandling med andre LXR-ligander påvirket OA-opptaket i mindre grad. Litt økt opptak ble også sett etter behandling av cellene med 22-R-HC, særlig ved høyeste konsentrasjon (10 μM).

22-S-HC påvirket ikke opptaket i nevneverdig grad (Fig. 3.2 A). Heller ikke 27-HC så ut til å påvirke opptaket. Ved behandling med DMHCA ble det sett en økning av OA-opptaket som var størst ved den laveste konsentrasjonen av DMHCA (Fig. 3.2 B). Det kunne se ut som om den høyeste konsentrasjonen av DMHCA har påvirket cellene på en ugunstig måte, da celleprotein enkelte ganger var lavere i disse brønnene enn i de andre brønnene på celleplata (data ikke vist).



Figur 3.3 Oksidasjon av oljesyre (OA) til CO₂ etter forbehandling med substansene indikert på x-aksen de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 µCi/ml, 100 µmol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt ± SEM (n=3). [#]p < 0.05 mot kontroll (0.1% DMSO). 22-R-HC, 22-R-hydroksykolesterol; 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol; 27-HC, 27-hydroksykolesterol; DMHCA, N,N-dimetyl-3β-hydroksyl-choleamid.

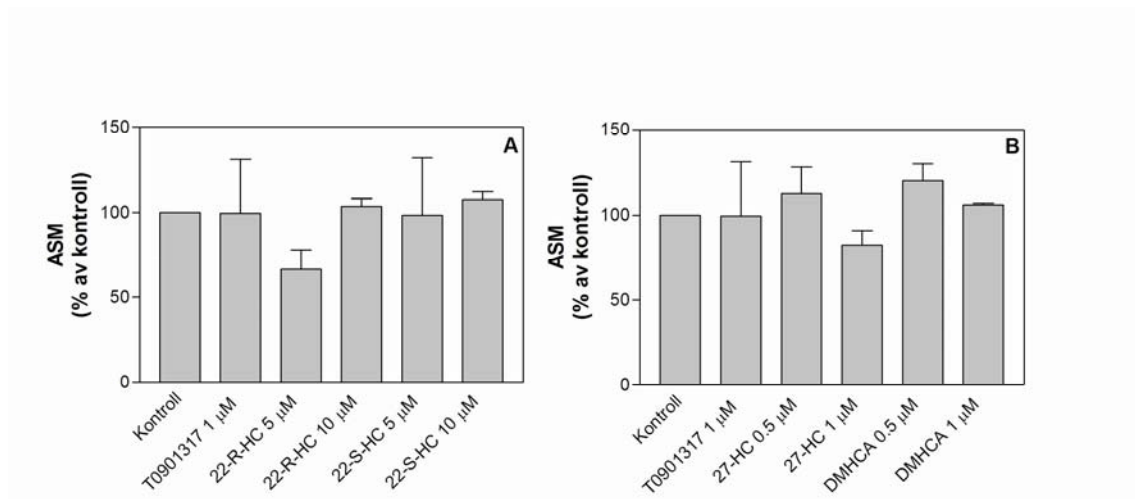
Behandling av cellene med T0901317 så ut til å øke oksidasjonen av OA til CO₂ med 11%. Økningen i oksidasjon var imidlertid ikke signifikant. Oksidasjonen ble hemmet ved behandling med 22-R-HC, hemmingen var størst ved laveste konsentrasjon (5 µM). Det så også ut til at behandling med 22-S-HC hemmet OA-oksidasjonen, men her så hemmingen ut til å være størst ved høyeste konsentrasjon (10 µM) (Fig. 3.3 A). Behandling av cellene med 27-HC ga en markant, doseavhengig hemming av OA-oksidasjonen. Hemmingen var signifikant for høyeste konsentrasjon av 27-HC (1 µM). DMHCA så også ut til å hemme oksidasjonen av OA til CO₂, men i mindre grad enn 27-HC. Også her så hemmingen ut til å være doseavhengig (Fig. 3.3 B).



Figur 3.4 Forholdet mellom oksidasjon av oljesyre (OA) til CO₂ og celleassosiert (CA) OA etter forbehandling med substansene indikert på x-aksen de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 µCi/ml, 100 µmol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt ± SEM (n=3). [#]p < 0.05 mot kontroll (0.1% DMSO). 22-R-HC, 22-R-hydroksykolesterol; 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol; 27-HC, 27-hydroksykolesterol; DMHCA, N,N-dimetyl-3β-hydroksyl-cholenamid.

Forholdet mellom oksidasjon av OA til CO₂ og celleassosiert OA ble litt redusert ved behandling med både T0901317, 22-R-HC og 22-S-HC (Fig. 3.4 A). Det samme så ut til å være tilfelle for behandling av cellene med 27-HC, her ble det sett en tydelig doseavhengig reduksjon av CO₂/CA som var signifikant for den høyeste konsentrasjonen av 27-HC (1 µM). DMHCA så også ut til å kunne redusere forholdet mellom oksidasjon av OA til CO₂ og celleassosiert OA (Fig 3.4 B).

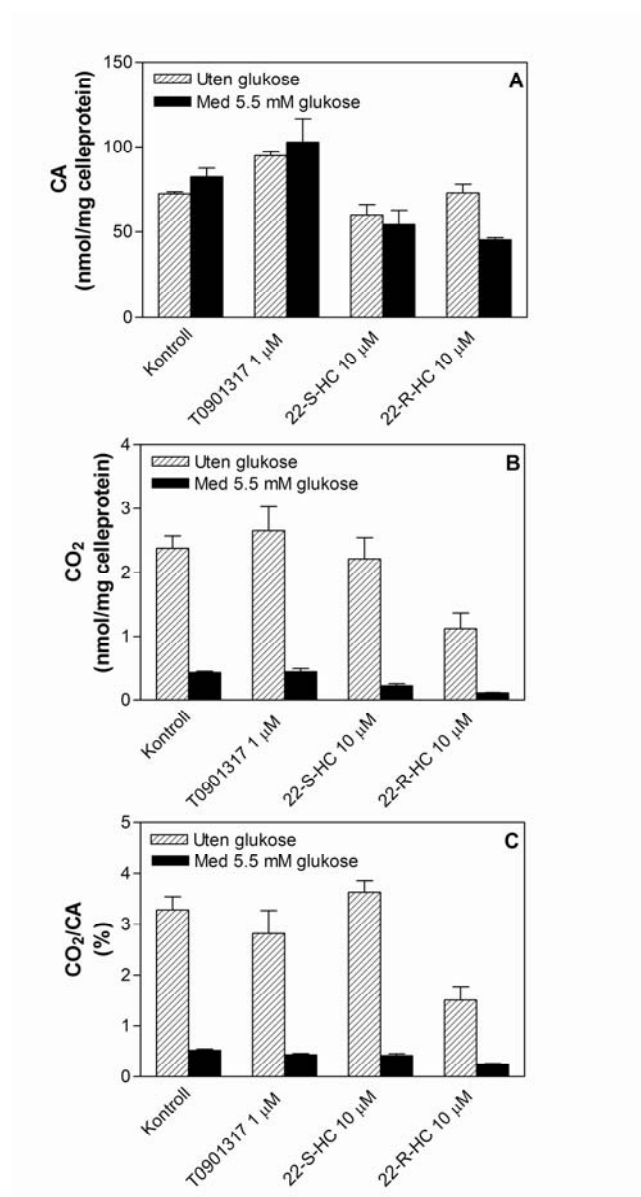
Alle LXR-ligandene brukt i forsøkene så ut til å redusere forholdet CO₂/CA i større eller mindre grad. Reduksjon av forholdet innebar at mer OA ble akkumulert i cellen i forhold til det som ble oksidert, noe som ville kunne gi lipidakkumulering i cellene over tid.



Figur 3.5 Oksidasjon av oljesyre (OA) til syreløselige metabolitter (ASM) etter forbehandling med substansene indikert på x-aksen de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 $\mu\text{mol/l}$). Resultatene representerer gjennomsnitt \pm SEM ($n=2$). 22-R-HC, 22-R-hydroksykolesterol; 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol; 27-HC, 27-hydroksykolesterol; DMHCA, N,N-dimetyl-3 β -hydroksyl-cholenamid.

β -oksidasjon av OA til syreløselige metabolitter (ASM) ble redusert ved behandling av cellene med 22-R-HC, men kun ved laveste konsentrasjon (5 μM) (Fig. 3.5 A). Reduksjon ble også sett ved behandling med 27-HC i høyeste konsentrasjon (1 μM), ellers ingen store endringer (Fig. 3.5 B). T0901317, 22-S-HC og DMHCA så ikke ut til å påvirke β -oksidasjonen i nevneverdig grad.

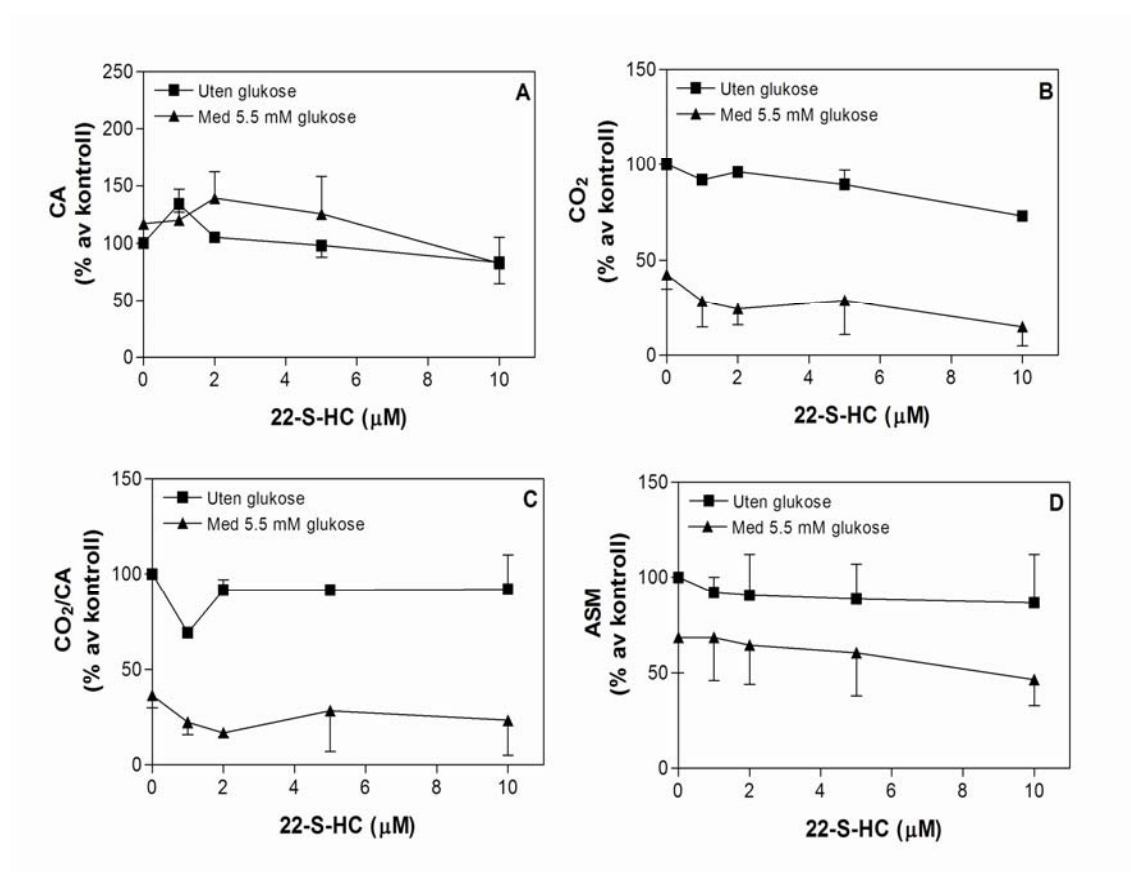
3.1.3 Glukose påvirker OA-metabolismen- ulike LXR-ligander



Figur 3.6 Celleassosiert (CA) oljesyre (OA) (A), oksidasjon av oljesyre til CO₂ (B) og forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA (C) etter forbehandling med substansene indikert på x-aksen de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 μ Ci/ml, 100 μ mol/l) med eller uten 5.5 mM glukose i mediet. Resultatene representerer gjennomsnitt av 4 målinger \pm SEM (n=1). 22-R-HC, 22-R-hydroksykolesterol; 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol.

Opptaket av OA økte litt ved behandling med forsøksmedium som inneholdt glukose også for kontrollen og for cellene var forbehandlet med T0901317. I cellene forbehandlet med 22-R-HC og 22-S-HC ble opptaket av OA hemmet av tilstedeværelse av glukose i forsøksmediet (Fig. 3.6 A). Dersom det hadde blitt utført flere forsøk, ville det sannsynligvis vært mulig å vise en økning i opptaket for alle behandlinger. Resultater fra andre forsøk tilsier dette (data ikke vist). Oksidasjonen av OA til CO₂ ble sterkt hemmet av glukose i forsøksmediet, gjennomsnittlig nesten 8 ganger redusert sammenlignet med medium uten glukose (Fig. 3.6 B). Dette gjaldt for alle forbehandlinger. Tilstedeværelse av glukose under behandlingen av cellene med OA undertrykte oksidasjon av OA til CO₂. Forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA ble i likhet med oksidasjonen også sterkt redusert ved eksponering for glukose. Dette gjaldt alle behandlinger. Ratioen CO₂/CA var nesten 7 ganger lavere ved behandling med forsøksmedium inneholdende glukose sammenlignet med medium uten glukose (Fig. 3.6 C). Dette innebar at en mye mindre andel fettsyra ble oksidert, og nettoeffekten ble akkumulering av OA i cellene.

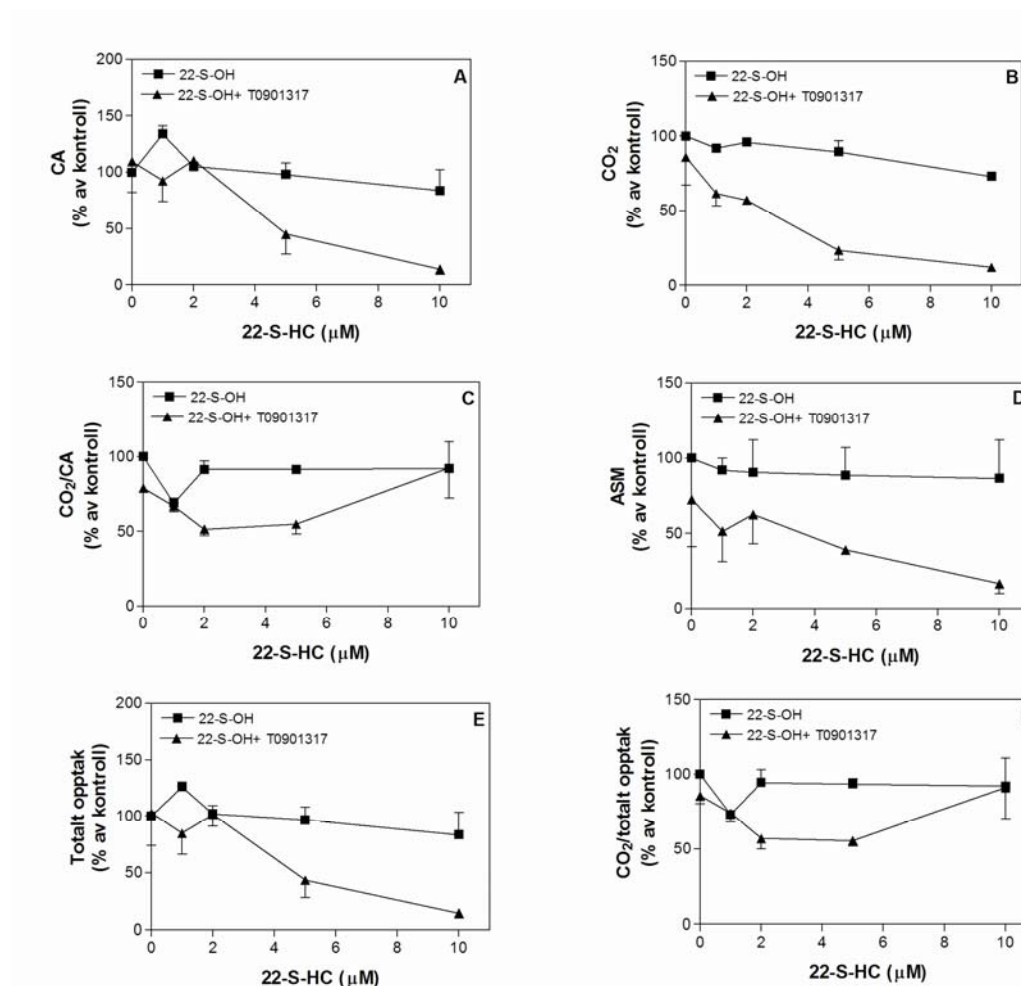
3.1.4 Glukose påvirker OA-metabolismen- dose-respons 22-S-HC



Figur 3.7 Celleassosiert (CA) oljesyre (OA) (A), OA-oksidasjon til CO₂ (B), forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA (C) og OA-oksidasjon til syreløselige metabolitter (ASM) (D) etter forbehandling av cellene med ulike konsentrasjoner av 22-S-hydroksykolesterol de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentet ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 µCi/ml, 100 µmol/l), med eller uten 5.5 mM glukose i mediet. Resultatene representerer gjennomsnitt ± SEM (n=2). 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol.

Opptaket av OA økte litt ved laveste konsentrasjon av 22-S-HC, ellers ble det litt redusert med økende konsentrasjon av 22-S-HC. Eksponering av cellene for glukose medførte ingen større forandringer i opptaket. (Fig. 3.7 A). Dette var i motsetning til tidligere forsøk der OA-opptaket ble vist å øke ved tilstedeværelse av glukose. Oksidasjonen av OA til CO₂ ble hovedsakelig redusert med økende konsentrasjon av 22-S-HC. Tilsetning av glukose i forsøksmediet medførte en sterk hemming av

OA-oksidasjonen ved alle konsentrasjoner av 22-S-HC. Oksidasjonen ble redusert med gjennomsnittlig 70% sammenlignet med behandling uten glukose (Fig. 3.7 B). Forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA var tilnærmet uendret uavhengig av konsentrasjonen av 22-S-HC. Tilsetning av glukose medførte at ratioen CO₂/CA ble redusert for alle konsentrasjoner av 22-S-HC. Den gjennomsnittlige reduksjonen var på 71% i forhold til behandling uten glukose (Fig. 3.7 C). β-oksidasjon av OA til syreløselige metabolitter (ASM) ble ikke påvirket i nevneverdig grad av behandlingen av cellene med de ulike konsentrasjonene av 22-S-HC. Tilsetning av glukose i forsøksmediet medførte en betydelig undertrykking av cellenes β-oksidasjon. I gjennomsnitt ble ASM redusert med 33% sammenlignet med behandling uten glukose (Fig. 3.7 D).

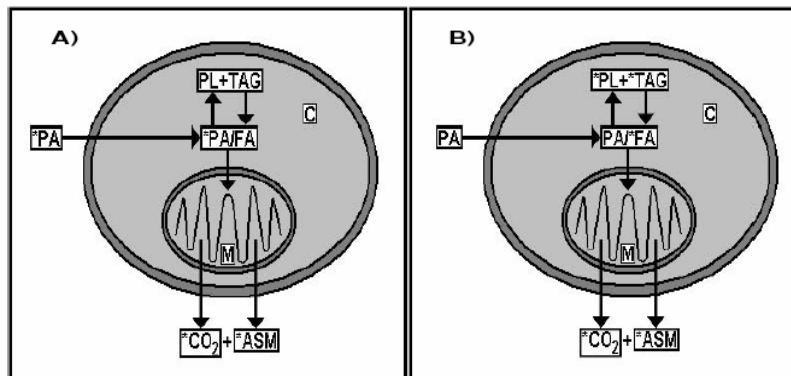
3.1.5 OA-metabolisme- 22-S-HC \pm T0901317

Figur 3.8 Celleassosiert (CA) oljesyre (OA) (A), OA-oksidasjon til CO₂ (B), forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA (C), OA-oksidasjon til syreløselige metabolitter (ASM) (D), samlet opptak av oljesyre uttrykt som summen av celleassosiert OA, OA oksidert til CO₂ og OA oksidert til ASM (E) og forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og samlet opptak av OA (F) etter forbehandling av cellene med ulike konsentrasjoner av 22-S-hydroksykolesterol aleine eller i kombinasjon med T0901317 1 μ mol/l de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentet ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 μ Ci/ml, 100 μ mol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt \pm SEM (n=2). 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol.

Da cellene ble behandlet med en kombinasjon av 22-S-HC og T0901317, forble OA-opptaket likt eller sank betraktelig sammenlignet med behandling med 22-S-HC aleine. Særlig for de to høyeste konsentrasjonene av 22-S-HC (5 μ M og 10 μ M) var nedgangen markant. Den gjennomsnittlige reduksjonen var på 56% sammenlignet med behandlingen med bare 22-S-HC (Fig. 3.8 A). Ved behandling med 22-S-HC i kombinasjon med T0901317 ble OA-oksidasjonen markant redusert sammenlignet med behandling med 22-S-HC aleine. Den gjennomsnittlige reduksjonen var på 49% (Fig. 3.8 B). Ved behandling med kombinasjon av 22-S-HC og T0901317 forble forholdet mellom OA oksidert til CO₂ og celleassosiert OA omtrent uendret eller noe redusert i forhold til behandling med bare 22-S-HC. Gjennomsnittlig reduksjon var på 21% (Fig. 3.8 C). Kombinasjon av 22-S-HC og T0901317 medførte tydelig hemming av β -oksidasjonen av OA til syreløselige metabolitter (ASM) sammenlignet med behandling med 22-S-HC aleine. Gjennomsnittlig reduksjon i β -oksidasjon var på 48% (Fig. 3.8 D). Totalt opptak av OA ble regnet ut ved summering av celleassosiert OA, CO₂ og ASM. Det totale opptaket økte ved laveste konsentrasjon av 22-S-HC, ellers forble det uendret i forhold til kontrollen. Kombinasjon av 22-S-HC og T0901317 medførte at det totale opptaket forble omtrent uendret eller redusert. Den gjennomsnittlige reduksjonen var på 43% (Fig. 3.8 E). Oksidasjonen av OA til CO₂ sammenlignet med det totale opptaket ble redusert ved den laveste konsentrasjonen av 22-S-HC, ellers var det uforandret sammenlignet med kontrollen. Ved kombinasjon av 22-S-HC og T0901317 forble dette forholdet uendret eller redusert med gjennomsnittlig 24% (Fig. 3.8 F).

Den hemmende effekten av T0901317 på både opptak og oksidasjon var det motsatte av det som ble forventet. Disse resultatene står i kontrast til andre resultater i denne oppgaven, der positiv effekt av T0901317 ble vist både på opptak (Fig. 3.2 A) og oksidasjon (Fig. 3.3 A) av OA. Forklaringen på at resultatene ved forbehandling med kombinasjonen av 22-S-HC og T0901317 ga lavere resultater enn 22-S-HC aleine kunne være at cellene vokste dårligere ved forbehandling med kombinasjonen. Cellulært protein var ofte svært lavt spesielt ved de to høyeste konsentrasjonene av 22-S-HC sammen med T0901317 (data ikke vist). Trolig hadde kombinasjonen toksisk virkning på cellene.

3.1.6 Sammenligning av kronisk og akutt forbehandling med OA

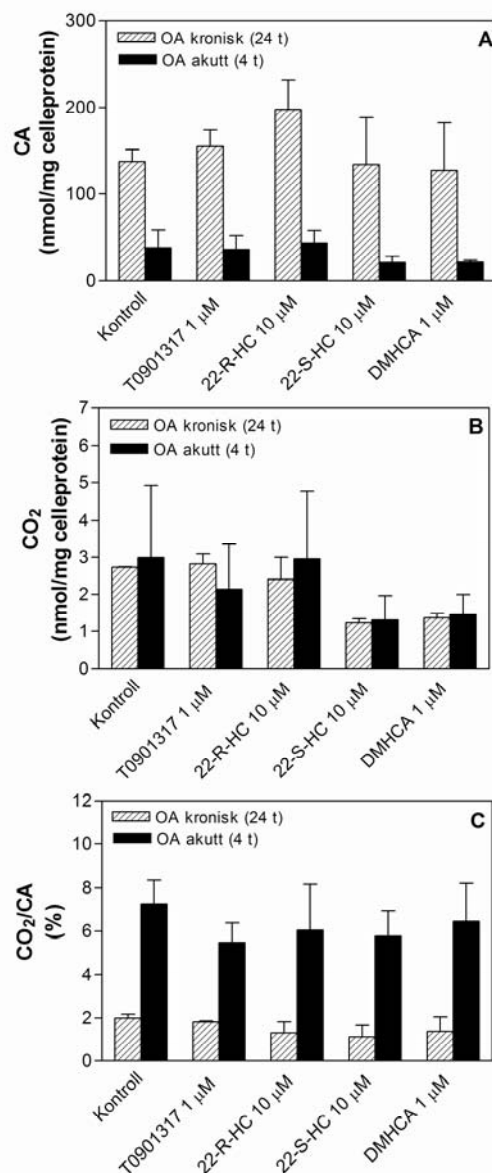


Figur 3.9

- A) Illustrerer **akutt behandling** (4 timer) med radioaktivt merket fettsyre, i dette tilfellet [$1-^{14}\text{C}$]palmitinsyre (PA). Det meste av den radioaktivt merkede fettsyra går direkte til oksidasjon i mitokondriet, og det dannes radioaktivt merket CO_2 og ASM. Radioaktivt merket fettsyre inkorporeres i liten grad i cellens lagringslipider som fosfolipider (PL) og triglyserider (TAG) etter akutt behandling.
- B) Illustrerer **kronisk behandling** (24 timer) med radioaktivt merket fettsyre, i dette tilfellet [$1-^{14}\text{C}$]palmitinsyre (PA). Ved kronisk behandling tas fettsyra opp og inkorporeres i større grad i lagringslipider i cella sammenlignet med akutt behandling. Oksidasjon til radioaktivt merket CO_2 og ASM etter kronisk behandling med radioaktivt merket fettsyre betyr at fettsyrene som oksideres kommer fra de intracellulære lipidlagrene i cella.

*, [^{14}C]-radioaktivitet; FA, fettsyre; ASM, syreløselige metabolitter; C, cytosol; M, mitokondrie.

Figuren er fra hovedfagsoppgaven til Andreas J. Wensaas (2003).



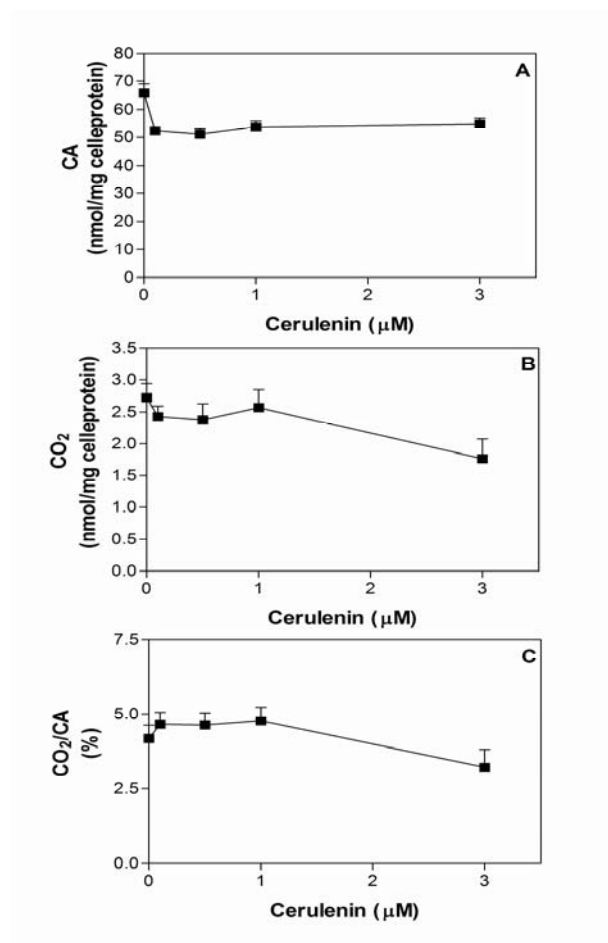
Figur 3.10 Celleassosiert (CA) oljesyre (OA) (A), OA-oksidasjon til CO₂ (B) og forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA (C) etter forbehandling med substansene indikert på x-aksen de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 µCi/ml, 100 µmol/l) for akutt behandling og i 24 timer med [1-¹⁴C]OA (1 µCi/ml, 20 µmol/l) for kronisk behandling, samt tilsvarende konsentrasjon av umerket OA når cellene ikke ble inkubert med radioaktivt merket OA. Resultatene representerer gjennomsnitt ± SEM (n=2). 22-R-HC, 22-R-hydroksykolesterol; 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol; DMHCA, N,N-dimetyl-3β-hydroksyl-choleamid.

Ved akutt behandling med OA så opptaket ut til å øke litt ved behandling med 22-R-HC. Spredningen var imidlertid stor. Opptaket ble redusert i cellene behandlet med 22-S-HC og DMHCA. T0901317 så ikke ut til å ha effekt på opptaket av OA. Ved kronisk behandling med OA ga T0901317 en litt større effekt på opptaket, men økningen var mindre enn for 22-R-HC. Forskjellen mellom opptaket etter kronisk og akutt behandling var markant. Ved kronisk behandling var opptaket av OA gjennomsnittlig nesten 4 ganger høyere enn ved akutt behandling (Fig. 3.10 A). Oksidasjon av OA til CO₂ ble redusert i forhold til kontrollen ved behandling med 22-S-HC og DMHCA. Dette gjaldt både etter kronisk og akutt OA-eksponering. Det så ikke ut til å være noen stor forskjell mellom oksidasjonen av OA til CO₂ etter kronisk og akutt behandling med OA (Fig. 3.10 B). Forholdet mellom OA oksidert til CO₂ og celleassosiert OA forble omtrent uendret ved forbehandling med de ulike LXR-ligandene sammenlignet med kontrollen. Dette gjaldt både etter kronisk og akutt OA-eksponering. Forholdet var imidlertid mye høyere ved akutt behandling sammenlignet med kronisk, gjennomsnittlig over 3 ganger høyere (Fig. 3.10 C). Ved akutt behandling ble en mye større andel av den OA som cellene tok opp oksidert videre til CO₂, i motsetning til ved kronisk behandling der en mye større andel av opptatt OA ble inkorporert i lagringslipider cellene.

3.1.7 Cerulenin- en FAS-hemmer

Cerulenin, som hemmer fettsyresyntase (FAS), ble testet ut for å undersøke om det kunne hemme den lipogene effekten en aktivering av LXR gir.

- *Dose-respons*

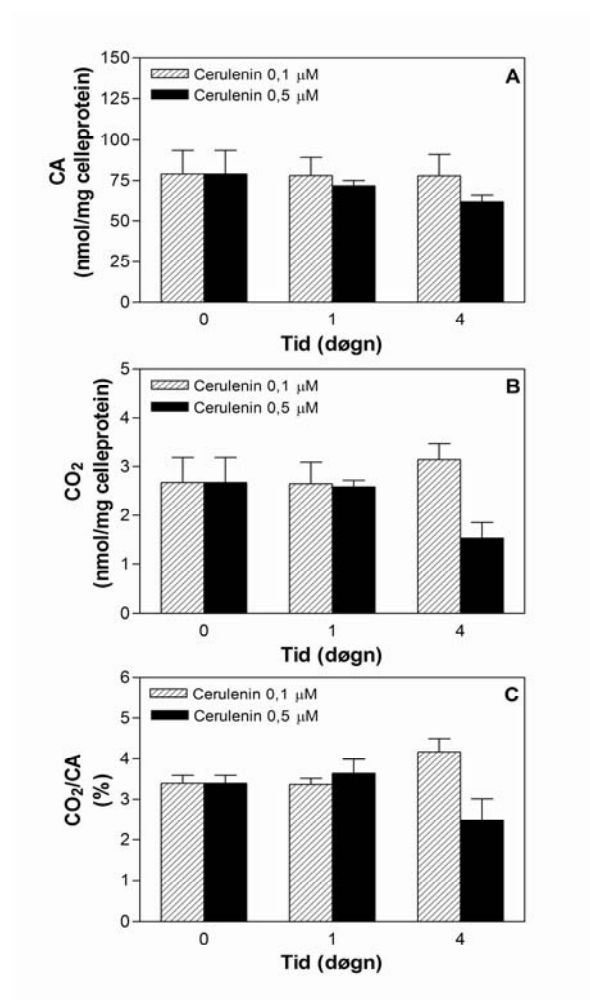


Figur 3.11 Celleassosiert (CA) oljesyre (OA) (A), OA-oksidasjon til CO₂ (B) og forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA (C) etter forbehandling av cellene med ulike konsentrasjoner av cerulenin i de siste 24 timene av differensieringsperioden. Eksperimentet ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 μCi/ml, 100 μmol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt av 4 målinger ± SEM (n=1).

Cerulenin reduserte opptaket av OA med gjennomsnittlig 19% sammenlignet med kontrollen uten cerulenin. Reduksjonen var tilnærmet lik for alle konsentrasjonene av cerulenin (Fig. 3.11 A). Oksidasjonen av OA til CO₂ ble også redusert da cellene ble

eksponert for cerulenin. Den gjennomsnittlige reduksjonen var på 16% sammenlignet med kontrollen uten cerulenin. Det ble også observert at den høyeste konsentrasjonen hadde en større evne til å hemme oksidasjonen enn de andre (Fig. 3.11 B). Forholdet mellom OA oksidert til CO₂ og celleassosiert OA økte litt ved lave konsentrasjoner av cerulenin sammenlignet med kontrollen. Ved høyeste konsentrasjon av cerulenin ble forholdet redusert noe (Fig. 3.11 C).

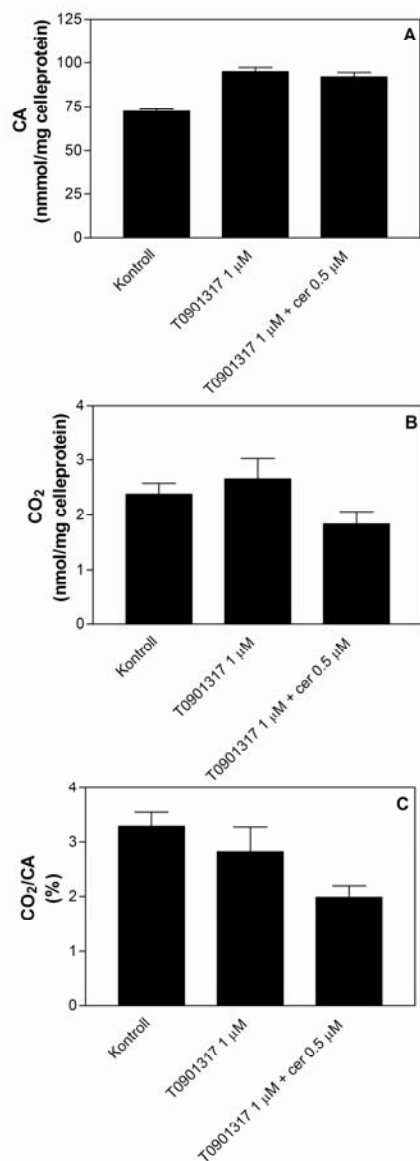
- **Tidskurve**



Figur 3.12 Celleassosiert (CA) oljesyre (OA) (A), OA-oksidasjon til CO₂ (B) og forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA (C) etter forbehandling av cellene med cerulenin 0.1 μmol/l og 0.5 μmol/l i de siste 24 timene og de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentet ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 μCi/ml, 100 μmol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt av 4 målinger ± SEM (n=1).

Cerulenin i laveste konsentrasjon så ikke ut til å ha innvirkning på opptaket av OA. En reduksjon i opptaket ble derimot sett da cellene ble eksponert for 0.5 μM cerulenin i 4 døgn, denne reduksjonen var på 22% sammenlignet med kontrollen uten cerulenin (Fig. 3.12 A). Ved eksponering i 24 timer så ikke cerulenin ut til å ha effekt på oksidasjonen av OA til CO_2 . Etter 4 døgn ble det sett en markant reduksjon i oksidasjonen ved behandling med 0.5 μM cerulenin, denne reduksjonen var på 43% sammenlignet med kontrollen (Fig. 3.12 B). Forholdet mellom OA-oksidasjon og celleassosiert OA ble også redusert ved behandling med 0.5 μM cerulenin. Reduksjonen var på 27% sammenlignet med kontrollen (Fig. 3.12 C).

- **T0901317 ± cerulenin**



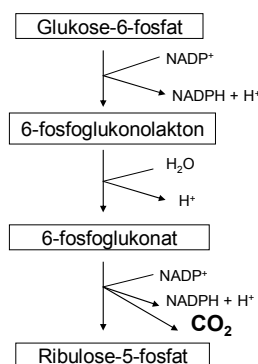
Figur 3.13 Celleassosiert (CA) oljesyre (OA) (A), OA-oksidasjon til CO₂ (B) og forholdet mellom OA-oksidasjon til CO₂ og celleassosiert OA (C) etter forbehandling av cellene med cerulenin 0.5 µmol/l de siste 24 timene og T0901317 1 µmol/l de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentet ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (1 µCi/ml, 100 µmol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt av 4 målinger ± SEM (n=1). Cer, cerulenin.

En klar økning i opptaket av OA ble også her sett ved behandling med T0901317. Denne økningen så ikke ut til å bli redusert av cerulenin (Fig. 3.13 A). Oksidasjon av OA til CO₂ økte litt ved forbehandling av cellene med T0901317. Her ble det sett at

cerulenin hemmet effekten av T0901317 på OA-oksidasjonen. Reduksjonen var på 31% sammenlignet med behandlingen med T0901317 aleine og 23% sammenlignet med kontroll (Fig. 3.13 B). Forholdet mellom oksidasjonen av OA til CO_2 og celleassosiert OA ble litt redusert med T0901317 og enda mer redusert med cerulenin i tillegg. Reduksjonen med cerulenin var på 29% sammenlignet med behandlingen med T0901317 aleine og 39% sammenlignet med kontroll (Fig. 3.13 C).

3.2 Forsøk med ulike glukoseisotoper

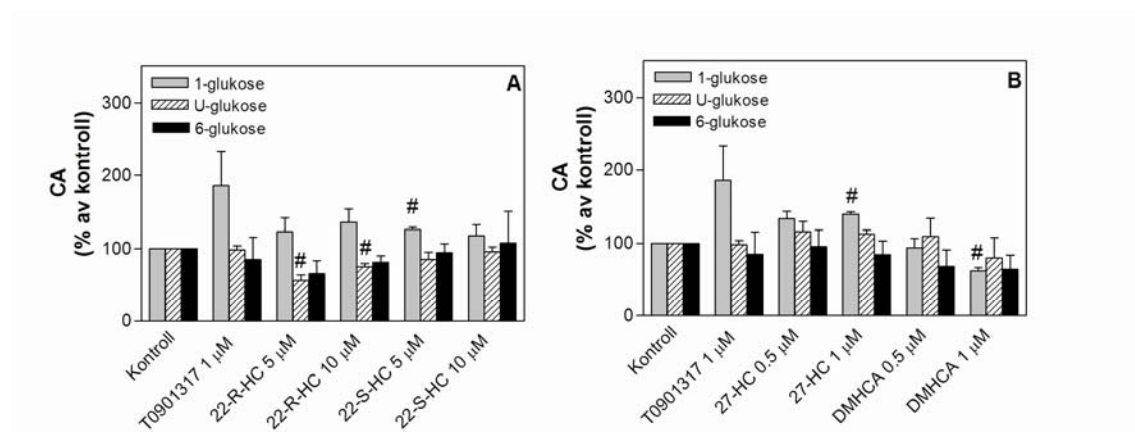
3.2.1 Sammenligning av glukosemetabolisme- ulike LXR-ligander



Figur 3.14 Pentosefosfatveien. I det siste trinnet spaltes det av et karbonatom i form av CO_2 . Dette atomet tilsvarer karbonatom nummer 1 i det opprinnelige glukosemolekylet. Figuren er en kopi av en figur fra følgende nettside: <http://www.indstate.edu/thcme/mwking/pentose-phosphate-pathway.html>.

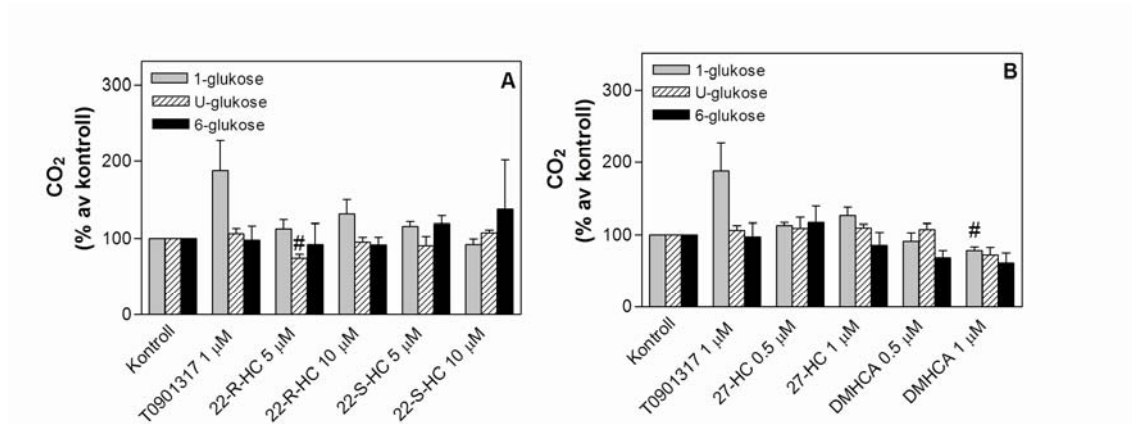
Ulike glukoseisotoper ble benyttet for å undersøke hva som skjer med glukose som tas opp i cellene. For 1-glukose vil en betydelig andel av glukosemolekylene få spaltet av det radiomerkede karbonatomet i pentosefosfatveien (Fig. 3.14) og derfor vil det være svært sannsynlig at radiomerket CO_2 produsert fra 1-glukose kommer fra ikke-mitokondriell oksidasjon. For U-glukose vil en mindre andel av produsert

radiomerket CO₂ komme fra pentosefosfatveien, mens for 6-glukose vil ingen radiomerkede karbonatomer spaltes av i pentosefosfatveien og følgelig vil all radiomerket CO₂ komme fra oksidasjon i mitokondriet (46)



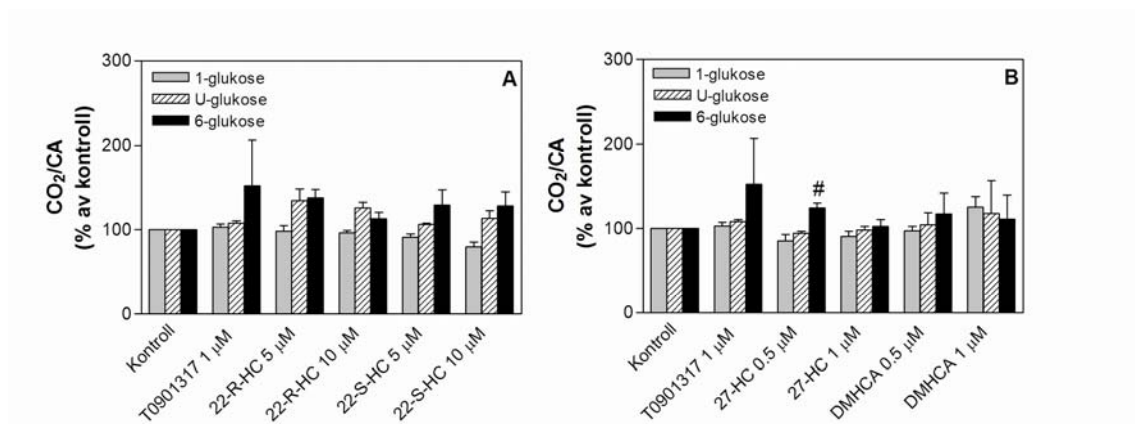
Figur 3.15 Celleassosiert (CA) glukose etter forbehandling med substansene indikert på x-aksen de siste 4 dagene av differensieringen. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]glukose (1 µCi/ml, 100 µmol/l), [U-¹⁴C]glukose (1 µCi/ml, 100 µmol/l) eller [6-¹⁴C]glukose (1 µCi/ml, 100 µmol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt ± SEM (n=3). #p < 0.05 mot kontroll (0.1% DMSO). 22-R-HC, 22-R-hydroksykolesterol; 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol; 27-HC, 27-hydroksykolesterol; DMHCA, N,N-dimetyl-3β-hydroksyl-cholenamid.

Behandling med T0901317 så ut til å øke celleassosiert 1-glukose, men for de andre isotopene ble det ikke sett effekt av T0901317. Økningen var på 86% sammenlignet med kontrollen. 22-R-HC så ut til å øke opptaket av 1-glukose, mens opptaket ble redusert for de to andre isotopene. For U-glukose var reduksjonen signifikant og på gjennomsnittlig 66% sammenlignet med kontroll. 22-S-HC medførte en signifikant økning i opptaket av 1-glukose, gjennomsnittlig økning var på 22% sammenlignet med kontroll (Fig. 3.14 A). 27-HC førte til en signifikant økning i opptaket av 1-glukose, gjennomsnittlig 36% sammenlignet med kontroll. DMHCA ga signifikant reduksjon av opptaket av 1-glukose, gjennomsnittlig 22% (Fig. 3.14 B).



Figur 3.16 Oksidasjon av glukose til CO₂ etter forbehandling med substansene indikert på x-aksen de siste 4 dagene av differensieringen. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]glukose (1 µCi/ml, 100 µmol/l), [U-¹⁴C]glukose (1 µCi/ml, 100 µmol/l) eller [6-¹⁴C]glukose (1 µCi/ml, 100 µmol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt ± SEM (n=3). #p < 0.05 mot kontroll (0.1% DMSO). 22-R-HC, 22-R-hydroksykolesterol; 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol; 27-HC, 27-hydroksykolesterol; DMHCA, N,N-dimetyl-3β-hydroksyl-choleamid.

Behandling med T0901317 så ut til å øke oksidasjonen av 1-glukose, men ikke oksidasjonen av U-glukose og 6-glukose. Økningen var på 87% sammenlignet med kontroll. Behandling med 22-R-HC førte til en signifikant reduksjon av oksidasjonen av U-glukose, gjennomsnittlig nedgang var på 16% sammenlignet med kontroll. 22-S-HC så ut til å kunne øke oksidasjonen av 6-glukose (Fig. 3.15 A). DMHCA så ut til å hemme oksidasjonen av både 1-glukose og 6-glukose. For 1-glukose var nedgangen i oksidasjon signifikant og gjennomsnittlig på 16% sammenlignet med kontroll (Fig. 3.15 B).

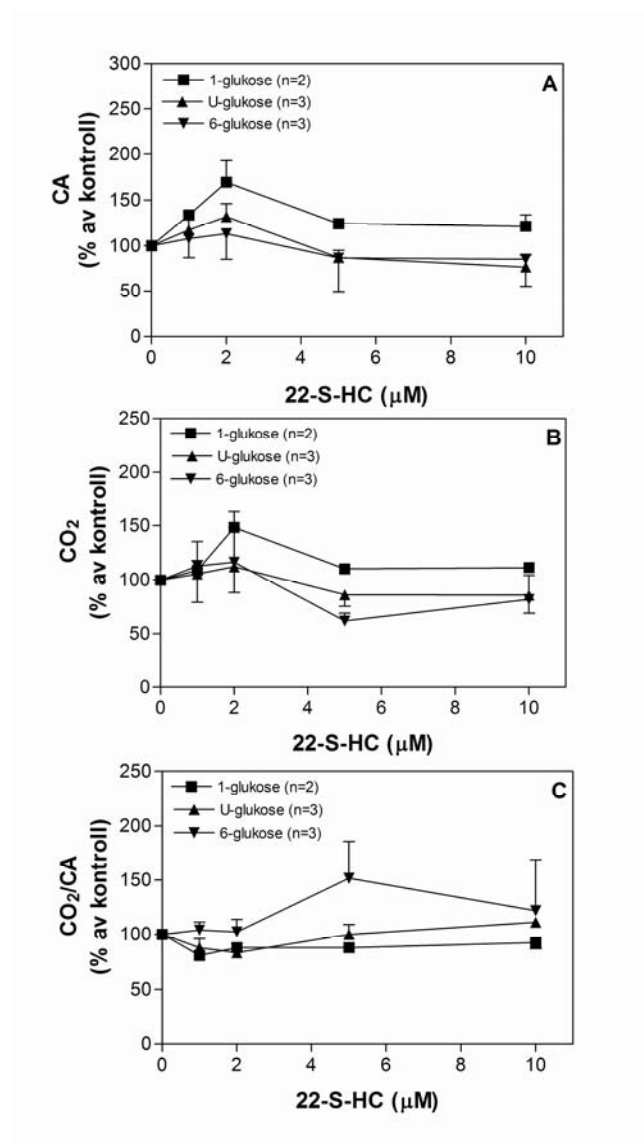


Figur 3.17 Forholdet mellom glukoseoksidasjon til CO₂ og celleassosiert (CA) glukose etter forbehandling med substansene indikert på x-aksen de siste 4 dagene av differensieringen. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]glukose (1 μ Ci/ml, 100 μ mol/l), [U-¹⁴C]glukose (1 μ Ci/ml, 100 μ mol/l) eller [6-¹⁴C]glukose (1 μ Ci/ml, 100 μ mol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt \pm SEM (n=3). [#]p < 0.05 mot kontroll (0.1% DMSO). 22-R-HC, 22-R-hydroksykolesterol; 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol; 27-HC, 27-hydroksykolesterol; DMHCA, N,N-dimetyl-3 β -hydroksyl-choleamid.

Behandling av cellene med T0901317 medførte økning av ratioen CO₂/CA for 6-glukose. Økningen var på 52% sammenlignet med kontroll. 22-R-HC så ut til å øke ratioen for U-glukose og 22-S-HC så ut til å øke ratioen for 6-glukose, men ingen av økningene var signifikante (Fig. 3.16 A). 27-HC medførte en signifikant økning av ratioen mellom oksidert og celleassosiert 6-glukose, gjennomsnittlig 13% økning sammenlignet med kontroll (Fig. 3.16 B).

Det ble også gjort forsøk med 6-glukose \pm insulin etter forbehandling med de ulike LXR-ligandene, men disse resultatene ble utelatt da det ikke ble funnet tydelige effekter av insulin.

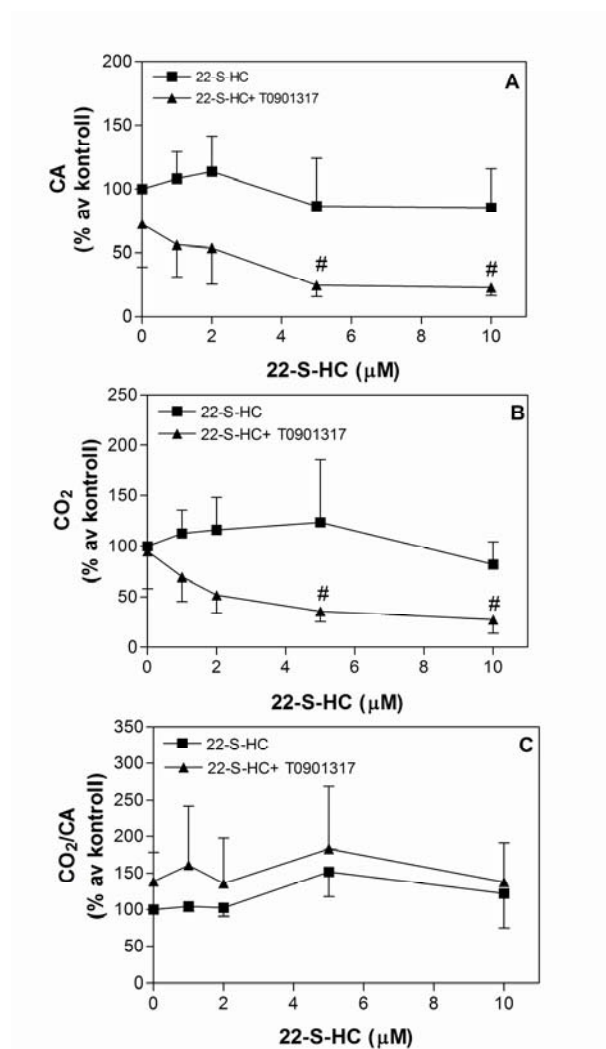
3.2.2 Glukosemetabolisme- dose-respons 22-S-HC



Figur 3.18 Celleassosiert (CA) glukose (A), oksidasjon av glukose til CO₂ (B) og forholdet mellom glukoseoksidasjon til CO₂ og celleassosiert glukose (C) etter forbehandling med ulike konsentrasjoner av 22-S-HC de siste 4 dagene av differensieringen. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [1-¹⁴C]glukose (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 $\mu\text{mol/l}$), [U-¹⁴C]glukose (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) eller [6-¹⁴C]glukose (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 $\mu\text{mol/l}$). Resultatene representerer gjennomsnitt \pm SEM (n=2 eller 3). #p < 0.05 mot kontroll (0.1% DMSO). 22-S-HC, 22-S-hydroksycholesterol.

Opptaket av de tre ulike glukoseisotopene forandret seg i samme retning med økende konsentrasjon av 22-S-HC. Opptaket økte ved behandling med 1 μ M og 2 μ M 22-S-HC, før det flatet ut eller ble redusert ved behandling med 5 μ M og 10 μ M 22-S-HC. Økningen i opptaket var mest markant for 1-glukose, her var økningen gjennomsnittlig 37% sammenlignet med kontrollen (Fig. 3.17 A). Oksidasjonen av 1-glukose til CO₂ økte markant ved de laveste konsentrasjonene av 22-S-HC før den flatet mer ut for de høyere konsentrasjonene. Økningen var på gjennomsnittlig 20% sammenlignet med kontrollen. For U-glukose og 6-glukose økte oksidasjonen litt ved de laveste konsentrasjonene av 22-S-HC før den sank noe ved de høyere konsentrasjonene av 22-S-HC (Fig. 3.17 B). Forholdet mellom oksidasjon av glukose til CO₂ og celleassosiert 6-glukose økte for alle konsentrasjonene av 22-S-HC. Størst var økningen for de to høyeste konsentrasjonene, gjennomsnittlig 37% sammenlignet med kontrollen. For de to andre glukoseisotopene var det ingen store endringer med økende konsentrasjoner av 22-S-HC (Fig. 3.17 C).

3.2.3 Glukosemetabolisme- 22-S-HC \pm T0901317



Figur 3.19 Celleassosiert (CA) glukose (A), oksidasjon av glukose til CO₂ (B) og forholdet mellom glukoseoksidasjon til CO₂ og celleassosiert glukose (C) etter forbehandling med ulike konsentrasjoner av 22-S-HC aleine eller i kombinasjon med T0901317 1 μ mol/l de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [6-¹⁴C]glukose (1 μ Ci/ml, 100 μ mol/l). Resultatene representerer gjennomsnitt \pm SEM (n=3). [#]p < 0.05 mot kontroll (0.1% DMSO). 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol.

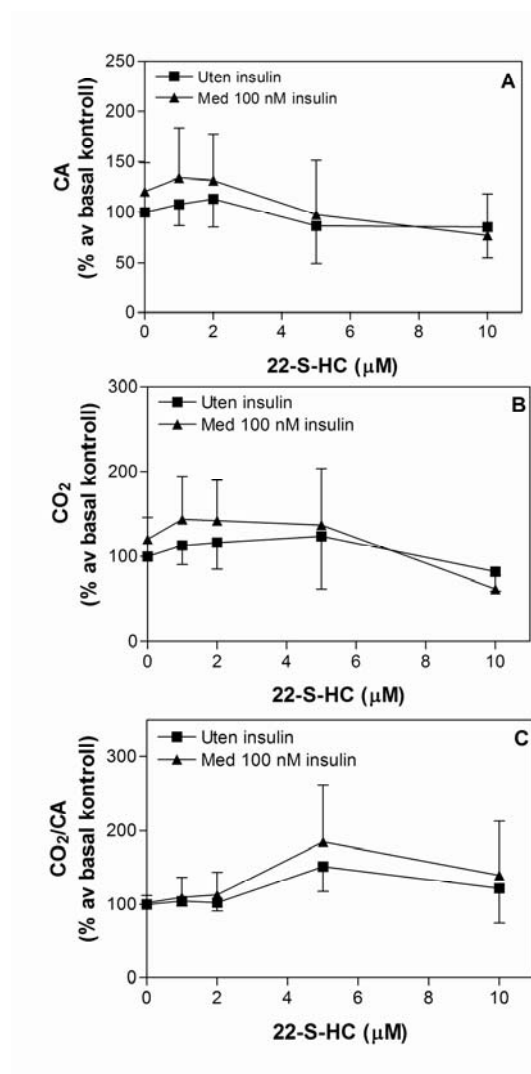
Behandling av cellene med kombinasjonen av 22-S-HC og T0901317 medførte en betydelig reduksjon i opptaket av 6-glukose sammenlignet med behandling med 22-S-HC aleine. Gjennomsnittlig reduksjon var på 55% sammenlignet med behandling med 22-S-HC aleine (Fig. 3.18 A). Da cellene ble behandlet med

22-S-HC i kombinasjon med T0901317 ble også oksidasjonen av 6-glukose betydelig redusert. Gjennomsnittlig reduksjon var på 47% sammenlignet med behandling med bare 22-S-HC (Fig. 3.18 B). Behandling av cellene med både 22-S-HC og T0901317 medførte også en økning i forholdet mellom oksidasjon av glukose til CO₂ og celleassosiert glukose sammenlignet med behandling med 22-S-HC aleine. Økningen var på gjennomsnittlig 32% sammenlignet med behandling med 22-S-HC aleine (Fig. 3.18 C).

Aktivering av LXR (for eksempel med agonisten T0901317) er vist å føre til økt opptak og oksidasjon av glukose. Men her ble opptak og oksidasjon hemmet ved behandling av cellene med T0901317. En forklaring på dette kan være at cellene vokste dårligere under forbehandlingen med kombinasjonen av 22-S-HC og T0901317 enn under forbehandlingen med 22-S-HC aleine. Det ble sett lave proteinverdier spesielt for de høyeste konsentrasjonene av 22-S-HC kombinert med T0901317 (data ikke vist).

Det ble også utført ett forsøk med U-glukose ± T0901317 (data ikke vist). Dette forsøket ga hovedsakelig resultater i samsvar med forsøkene med 6-glukose ± T0901317.

3.2.4 Glukosemetabolisme- 22-S-HC \pm insulin



Figur 3.20 Celleassosiert (CA) glukose (A), oksidasjon av glukose til CO₂ (B) og forholdet mellom glukoseoksidasjon til CO₂ og celleassosiert glukose (C) etter forbehandling med ulike konsentrasjoner av 22-S-HC de siste 4 dagene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer med [6-¹⁴C]glukose (1 μ Ci/ml, 100 μ mol/l), med eller uten 100 nmol/l insulin i forsøksmediet. Resultatene representerer gjennomsnitt \pm SEM (n=3). [#]p < 0.05 mot basal kontroll (0.1% DMSO). 22-S-HC, 22-S-hydroksykolesterol.

Opptaket av 6-glukose økte litt ved tilsetning av 100 nM insulin i forsøksmediet. Den gjennomsnittlige økningen var på 19% sammenlignet med cellene som ble behandlet med forsøksmedium uten insulin (Fig. 3.20 A). Resultatene var imidlertid ikke veldig pålitelige da variasjonen var stor. Oksidasjonen av 6-glukose til CO₂ økte også ved

tilsetning av insulin. Gjennomsnittlig økning var på 20% sammenlignet med behandlingen uten insulin (Fig. 3.20 B). Også her ble det sett stor variasjon i resultatene. Forholdet mellom oksidasjonen av 6-glukose til CO₂ og celleassosiert 6-glukose økte også ved behandling av cellene med insulin. Her var den gjennomsnittlige økningen på 11% sammenlignet med behandlingen uten insulin (Fig. 3.20 C). Det ble også gjort forsøk med U-glukose ± insulin, men data er utelatt da de ikke ga særlig effekt av insulin.

4. Diskusjon

I denne oppgaven ble det prøvd ut en ny metode for metabolismestudier i celler, multiwell-metoden. Denne metoden ble brukt til å måle opptak og oksidasjon av radiomerkede substrater i humane muskelceller dyrket i kultur. Cellene ble forbehandlet med ulike stoffer i de ulike forsøkene, med blant annet kjente LXR-ligander, en ikke tidligere testet FAS-hemmer (cerulenin) og oljesyre. Hensikten var å se på endringer i opptak og oksidasjon av glukose og fettsyre etter forbehandling med de ulike stoffene. Innvirkning av glukose på oljesyremetabolisme ble også testet ut.

4.1 Multiwell-metoden

Multiwell-metoden viste seg å være en velegnet metode for metabolismestudier i humane muskelceller. Metoden ga muligheter for å utføre forsøk med mange paralleller samtidig, og således ble det oppnådd svært mye data på kort tid og etter mye mindre arbeid enn ved de tidligere brukte metodene. To ulike forsøksoppsett er hittil utviklet, begge forutsetter at cellene dyrkes i 96-brønners brett. Substrat-oksidasjons forsøk i 96-brønners format muliggjør måling av oksidasjon av radiomerkede substrater på en mye mindre arbeidskrevende og mer effektiv måte sammenlignet med den tidligere brukte metoden med oppsamling av produsert CO₂ i flasker. SPA-metoden muliggjør måling av akkumulert radioaktivitet i cellene uten å høste cellene først. Dermed kan man måle opptaket fortløpende. Begge disse metodene innebærer at man sparer tid, arbeidsmengde og reagenser, og dermed også penger, i forhold til metodene som tidligere ble brukt til metabolismestudier i celler.

4.2 Effekt av glukose på metabolismen av oljesyre (OA)

Samspeilet mellom glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskulatur er nøye regulert. Et viktig begrep i denne sammenhengen er metabolsk fleksibilitet, som betegner cellenes evne til å skifte mellom oksidasjon av lipider og glukose. Dette innebærer at muskelcellene foretrekker oksidasjon av fettsyrer for å skaffe seg energi ved faste, og oksidasjon av karbohydrater som glukose ved insulinstimulering etter måltid (postprandialt). Denne fleksibiliteten er redusert ved insulinresistens og T2D. Suppressibilitet er betegnelsen på evnen glukose har til å undertrykke fettsyreoksidasjonen i cellene (6, 8). Hvordan fettsyrer og glukose gjensidig påvirker hverandres metabolisme i muskel er lite undersøkt. I denne oppgaven ble det gjort forsøk for å undersøke hvordan glukose påvirker metabolismen av oljesyre.

Forsøk der celler ble eksponert for radioaktiv OA med og uten glukose i forsøksmediet viste at glukose førte til en økning av celleassosiert OA (Fig. 3.1 A og 3.6 A). Økningen av OA-opptaket ved tilstedeværelse av glukose i mediet kan ha ulike årsaker. En teori er at en betydelig del av glukosen blir omdannet til glyserol som inngår i lagringslipider (TAG) i cellen, og at lipogenesis og forestring av OA til komplekse lipider dermed øker. En annen forklaring kan være at glukosen blir forbrent i cellene og at det dermed blir dannet mer ATP til å drive enzymet acyl-CoA syntetase, som aktiverer fettsyrer for transport inn i mitokondriene og for forestring til komplekse lipider. Det ble også sett en betydelig redusert oksidasjon av OA til CO₂ i Krebs syklus ved tilstedeværelse av glukose i forsøksmediet (Fig. 3.1 B, 3.6 B og 3.7 B). En reduksjon av β -oksidasjon av OA til syreløselige metabolitter (ASM) ble også observert (Fig. 3.7 D). Glukosens undertrykking av fettsyreoksidasjonen som ble sett i disse forsøkene er i tråd med teorien om metabolsk fleksibilitet og suppressjon beskrevet av Ukropcova *et al.* (6). Årsaken til denne hemmingen kan være at når glukose metaboliseres så blir det dannet mer malonyl-CoA. Malonyl-CoA er forløperen for fettsyredannelse i lipogenesis, og har evnen til å hemme karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT-1) som transporterer fettsyrer inn i mitokondriet for oksidasjon (47). CPT-1 er det hastighetsbegrensende enzymet i fettsyreoksidasjon, og hemming av transportøren vil følgelig medføre redusert fettsyreoksidasjon. Denne teorien er i samsvar med resultatene fra forsøkene i denne

oppgaven. Som en følge av det økte opptaket og den samtidig reduserte oksidasjonen av OA ble forholdet mellom OA oksidert til CO₂ og celleassosiert OA (Fig. 3.1 C, 3.6 C og 3.7 C) også sterkt redusert, og nettoeffekt ble lipidlagring i cellene.

I disse forsøkene ble det også observert at jo mer OA cellene ble tilført, jo mer OA ble tatt opp og oksidert (Fig. 3.1). Dette kalles adapterbarhet og er tidligere beskrevet av Ukropcova *et al.* (6). Adapterbarheten påvirkes av insulinsensitiviteten i kroppen, og personer med høy insulinsensitivitet har større kapasitet til å øke fettsyreoksidasjonen ved tilførsel av høye konsentrasjoner av fettsyrer.

4.3 Effekter av 22-S-hydroksykolesterol (22-S-HC)

22-S-hydroksykolesterol (22-S-HC) er en syntetisk ligand for LXR som tidligere er beskrevet å være inaktiv (42) eller å teoretisk kunne virke som en antagonist (34). I forsøkene i denne oppgaven ble det vist at 22-S-HC påvirker både lipid- og glukosemetabolismen.

4.3.1 Effekter på oljesyremetabolismen

Det er tidligere vist at 22-S-HC fører til redusert syntese av komplekse lipider og at denne LXR-liganden undertrykker enkelte gener involvert i lipogenese og lipidomsetning. Eksempler på gener som undertrykkes er fettsyretransportøren CD36/FAT, stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) og fettsyresyntase (FAS) (43). I denne oppgaven ble effekten til 22-S-HC på opptak og oksidasjon av OA undersøkt. Det ble sett at opptaket ikke ble påvirket i særlig grad (Fig. 3.2 A), mens oksidasjonen så ut til å bli litt hemmet (Fig 3.4 A). Hemmingen av oksidasjonen så ut til å være doseavhengig. β -oksidasjon til ASM så imidlertid ut til å forbli uendret ved behandling med 22-S-HC. Redusert lipidoksidasjon er i samsvar med resultatene fra Kase *et al.* (43).

I denne oppgaven ble det også gjort dose-responsforsøk der celler ble behandlet med ulike konsentrasjoner av 22-S-HC. Her ble både oksidasjonen og opptaket av OA i liten grad påvirket av økende konsentrasjoner av 22-S-HC (Fig. 3.8 A, B, D, E). En liten reduksjon i opptak og oksidasjon av OA ble sett med økende konsentrasjoner av 22-S-HC, men reduksjonen var forsvinnende liten.

Det ble også gjort forsøk med behandling av celler med 22-S-HC aleine sammenlignet med behandling med kombinasjonen av 22-S-HC og den syntetiske LXR-agonisten T0901317 (Fig. 3.8 A-E). Det ble forventet at kombinasjonen ville øke opptaket og oksidasjonen av OA sammenlignet med 22-S-HC aleine, da T0901317 er en kjent LXR-agonist som både i forsøkene i denne oppgaven og tidligere (33) er vist å kunne øke opptak og oksidasjon av fettsyrer, og 22-S-HC er vist å ha en antagonistisk virkning på LXR (34). I forsøkene i denne oppgaven ble imidlertid det motsatte observert; kombinasjonen av 22-S-HC og T0901317 reduserte både OA-opptak (Fig. 3.7 A) og OA-oksidasjon (Fig. 3.7 B, D) sammenlignet med behandling med 22-S-HC aleine. Den trolig viktigste grunnen til de motsatte resultatene er at cellene ikke vokste like godt ved en kombinasjon av 22-S-HC og T0901317 som da 22-S-HC ble brukt aleine. Det ble sett lave verdier for celleprotein, spesielt for de høyeste konsentrasjonene av 22-S-HC i kombinasjon med T0901317.

4.3.2 Effekter på glukosemetabolismen

Tre ulike glukoseisotoper ble brukt i disse forsøkene. Resultatene varierer med isotopene på grunn av at de omsettes forskjellig ved metabolisme i kroppen (Fig. 3.14). Når oksidasjonen av 1-merket glukose måles kan det radiomerkede karbonatomet spaltes av som CO_2 i pentosefosfatveien. Selv om man måler en stor mengde produsert CO_2 , er det ikke sikkert resultatet gir et riktig bilde av glukoseoksidasjonen i mitokondriene (Krebs syklus) da det er mulig at en stor andel av produsert CO_2 faktisk kommer fra pentosefosfatveien. For 6-merket glukose er det sikkert at all produsert CO_2 kommer fra mitokondriet, da karbon nummer 6 ikke kan spaltes av i pentosefosfatveien. For uniformsmerket glukose vil litt av den produserte CO_2 komme fra pentosefosfatveien, men en mindre andel enn for 1-glukose (46).

I denne oppgaven ble det vist at opptaket av 1-glukose i cellene økte signifikant etter forbehandling med 22-S-HC (Fig. 3.15 A). Det ble også vist at 22-S-HC så ut til å øke oksidasjonen av glukose, men dette ble vist tydeligst for 6-glukose (Fig. 3.16 A). Samtidig økte også forholdet mellom oksidasjon og opptak av glukose, noe som tydet på at mer glukose ble oksidert i forhold til det som ble tatt opp. Dette var også mest tydelig for 6-glukose (Fig. 3.17 A). Disse resultatene samsvarer med resultater fra tidligere forsøk. Det er blant annet vist at kronisk behandling av humane muskelceller med 22-S-HC øker glukosetransport og -oksidasjon (Hovedoppgave, Bård Andersen, Farmasøytisk institutt, 2005).

I denne oppgaven ble det også gjort dose-responsforsøk der celler ble behandlet med ulike konsentrasjoner av 22-S-HC før glukoseopptak og -oksidasjon ble målt. Her ble det observert at opptaket av de ulike glukoseisotopene forandret seg i samme retning ved behandling med økende konsentrasjoner av 22-S-HC; økning ved de laveste konsentrasjonene av 22-S-HC og mer utflating ved de høyeste konsentrasjonene. Utslagene var mest tydelig for 1-glukose (Fig. 3.18 A). Den samme tendensen ble også sett for oksidasjonen av glukose til CO_2 ; en økning for de laveste konsentrasjonene av 22-S-HC og reduksjon for de høyere konsentrasjonene. Også her var utslaget størst for 1-glukose (Fig. 3.18 B). At utslaget var størst for 1-glukose kan komme av at CO_2 produsert i pentosefosfatveien i stor grad bidrar til måleresultatet for CO_2 .

Det ble også gjort forsøk der glukoseopptak og -oksidasjon i celler behandlet med 22-S-HC aleine ble sammenlignet med opptak og oksidasjon i celler behandlet med kombinasjonen av 22-S-HC og den syntetiske LXR-agonisten T0901317. Her ble det sett samme resultater som i de tilsvarende forsøkene med oljesyre, at oksidasjonen ble sterkt undertrykket ved tilstedeværelse av T0901317 sammenlignet med behandling med 22-S-HC aleine (Fig. 3.19 B). Det ble også vist at glukoseopptaket ble sterkt hemmet av T0901317 (Fig. 3.19 A). Dette er forskjellig fra resultatene vist av Kase *et al.* (33), der LXR-agonisten T0901317 er vist å øke både opptak og oksidasjon av glukose. Grunnen til dette uventede resultatet var antagelig, som for forsøkene med oljesyre, at cellene vokste generelt dårligere ved forbehandling med 22-S-HC og T0901317 enn ved forbehandling med 22-S-HC aleine. En annen årsak

kan være at både glukosekonsentrasjonen og glukoseisotopen brukt i forsøkene i denne oppgaven er annerledes enn i forsøkene utført av Kase *et al.*

4.4 Cerulenin

Cerulenin er en spesifikk hemmer av fettsyresyntase (FAS) som virker ved å hemme kondenseringen av acetyl- og malonyl-CoA i produksjonen av langkjedete fettsyrer (48). Det var interessant å teste ut cerulenin for å undersøke om stoffet hadde evnen til å motvirke den lipogene effekten av T0901317. Det er vist at aktivering av LXR ved hjelp av den syntetiske agonisten T0901317 øker fettsyreopptak og distribusjon til lagringslipider som diacylglycerol (DAG) og triacylglycerol (TAG) (33). Den lipogene effekten av LXR-aktivering er uønsket, da lipogenese vil gi økt lipidinnhold i lever og muskel, samt økt konsentrasjon av triglyserider i blodet. Disse effektene kan føre til aterosklerose, fettlever og insulinresistens. Cerulenin er også interessant i forbindelse med behandling av fedme. Forsøk på mus har vist at cerulenin kan føre til redusert matinntak samt en kraftig, reversibel reduksjon av kroppsvekt (49).

I forsøkene i denne oppgaven ble det vist at cerulenin så ut til å ha en hemmende effekt på både opptak av OA i cellene (Fig. 3.11 A) og oksidasjon av OA til CO₂ (Fig. 3.11 B). Det kan tenkes at dette skyldes hemmingen av FAS. Når FAS hemmes, hopper det seg opp malonyl-CoA i cellene. Malonyl-CoA hemmer karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT-1) som katalyserer transport av fettsyrer inn i mitokondriene (47). Tidligere er det også vist at cerulenin kan redusere aktiviteten av CPT-1 perifert *in vitro* (50). Dette kan forklare hemmingen av OA-oksidasjonen og -opptaket. Virkningen av cerulenin på cellene ble sammenlignet for behandling av cellene i 1 døgn og i 4 døgn. Også her ble det sett hemming av OA-opptak (Fig. 3.12 A) og -oksidasjon (Fig. 3.12 B), sterkest var hemmingen ved den høyeste konsentrasjonen av cerulenin i 4 døgn. Dette kan forklares med at cerulenin er en svak FAS-hemmer og at den derfor må virke en viss tid for å kunne hemme FAS betydelig.

Cerulenin ble også testet sammen med T0901317 for å undersøke om cerulenin kunne hemme den lipogene effekten av T0901317. Det ble sett at cerulenin ikke så ut til å hemme det betydelig økte OA-opptaket mediert av T0901317 (Fig. 3.13 A). Effekten av cerulenin på OA-oksidasjonen så imidlertid ut til å vise en betydelig hemming, både sammenlignet med kontrollen og behandlingen med T0901317 aleine (Fig. 3.13 B). Det er mulig at dette er forårsaket av opphopning av malonyl-CoA i cellene som beskrevet tidligere, og når mindre OA blir tilgjengelig for oksidasjon i cellene vil metabolismen endres i retning av oksidasjon av glukose i stedet for fettsyrer. Forholdet mellom oksidasjon og opptak av OA ble også endret med cerulenin til stede (Fig. 3.13 C). Det ble sett at lagringen av lipider i cellene så ut til å øke i forhold til oksidasjonen, og nettoeffekten ble lipidlagring i cellene.

4.5 Sammenligning av kronisk og akutt fettsyrebehandling

Insulinresistens opptrer på et tidlig stadium i utviklingen av type 2-diabetes, og antas å være en avgjørende faktor for utvikling av sykdommen (Fig. 1.1) (11).

Akkumulering av lipider i skjelettmuskulatur (IMTG) er foreslått å kunne påvirke insulinsignaler og bidra til den molekylære mekanismen bak insulinresistens i skjelettmuskulatur (8, 10). Det er foreslått at grunnen til akkumulering av triglyserider i skjelettmuskulaturen (IMTG) ved fedme skyldes blant annet redusert kapasitet for fettsyreoksidasjon (51).

I denne oppgaven ble det gjort forsøk med sammenligning av fettsyreopptak og -oksidasjon etter forbehandling av celler enten kronisk (24 timer) eller akutt (4 timer) med radioaktivt merket oljesyre (OA) (Fig. 3.9). Ved kronisk behandling ble OA i større grad inkorporert i lagringslipider i cellene, mens OA ved akutt behandling hovedsakelig ble tatt opp i mitokondriet og oksidert til CO₂ (Fig. 3.10 A). Dette er logisk, at mer fettsyre vil inkorporeres i lagringslipider jo lengre eksponeringstida for fettsyra er. Kronisk behandling med OA ga redusert oksidasjon i forhold til det som ble tatt opp, og nettoeffekten ble lipidlagring i cellene (Fig. 3.10 C). Oksidasjonen av OA var omtrent lik for både kronisk og akutt fettsyrebehandling (Fig 3.10 B). Dette viser at det ikke bare er fettsyrer som nettopp er tatt opp som oksideres, men at det også mobiliseres en betydelig andel fettsyrer fra det intracellulære lipidlageret til

oksidasjon. Ut fra dette forsøket kan det slås fast at en betydelig del av produsert CO₂ kommer fra oksidasjon av fettsyrer mobilisert fra intracellulære lipidlagre. Dette er interessant i forbindelse med type 2-diabetes, der det antas at akkumulering av triglyserider i blant annet skjelettmuskulatur (IMTG) er en faktor som bidrar til utvikling av insulinresistens. Dersom oksidasjonen fra disse lipidlagrene kunne økes eller lagringen kunne reduseres, ville det teoretisk kunne redusere insulinresistensen. Kanskje kan dette være et mål for terapi ved type 2-diabetes i framtida.

4.6 Effekter av andre LXR-ligander

Ulike ligander for LXR er identifisert, og disse er interessante å teste ut. Aktivisering av LXR medfører gunstige effekter som økt kolesteroltransport ut av celler og til leveren for ekskresjon fra kroppen, samt redusert glukoseproduksjon i lever samtidig som glukoseopptak i perifere vev økes via økt ekspresjon av blant annet glukosetransportøren GLUT4 (52). Dette medfører at LXR er interessante mål for utvikling av legemidler til behandling av kardiovaskulær sykdom og type 2-diabetes. Aktiveringen av LXR medfører imidlertid også ugunstige effekter som økt lipid-biosyntese og produksjon av triglyserider i leveren (52). Hittil har det ikke vært mulig å skille de gunstige og ugunstige effektene fra hverandre, og det pågår nå forskning for å identifisere reseptorselektive LXR-ligander som i større grad medierer de gunstige effektene og i mindre grad de ugunstige. Det er foreslått at LXR β -selektive agonister i større grad medierer gunstige effekter som økt HDL-kolesterol og stimulert revers kolesteroltransport uten samtidig akkumulering av triglyserider i lever (38).

4.6.1 Effekter på oljesyremetabolismen

I denne oppgaven ble det vist stimulerende effekt av den syntetiske LXR-agonisten T0901317 på opptaket (Fig. 3.2 A) og oksidasjonen (Fig. 3.3 A) av OA. Dette samsvarer med tidligere data, som har vist at aktivisering av LXR med T0901317 øker opptak og oksidasjon av fettsyrer, samt inkorporering av fettsyrer i komplekse lipider (33). Det er også vist tidligere at T0901317 øker ekspresjonen av gener involvert i lipogenese som CD36/FAT, SREBP-1c, SCD-1 og FAS (43), noe som kan stemme

overens med det økte opptaket og den økte oksidasjonen av OA sett i forsøkene i denne oppgaven.

22-R-hydroksykolesterol (22-R-HC) er vist å være en potent LXR-agonist i humane muskelceller, men den regulerer lipidmetabolismen forskjellig fra T0901317. 22-R-HC øker fettsyresyntesen, men øker ikke inkorporering av fettsyrer i lagringslipider sammenlignet med ubehandlede celler. Ekspresjonen av genene for SREBP-1c og ABCA1 øker, mens mRNA-uttrykk av gener som CD36/FAT, FAS og SCD-1 reduseres (43). I forsøkene i denne oppgaven ble det vist en svak økning i celleassosiert OA etter behandling av cellene med 22-R-HC (Fig. 3.2 A), samtidig som det ble sett en hemming av oksidasjonen av OA til CO₂ (Fig. 3.3 A). Nettoeffekten vil bli lipidlagring i cellene, noe som antas å være ugunstig.

27-hydroksykolesterol (27-HC) er en endogen ligand for LXR. I forsøk er det vist at denne liganden aktiverer LXR (37). I forsøkene i denne oppgaven ble det vist at behandling av cellene med 27-HC ikke hadde noen innvirkning på opptaket av OA (Fig. 3.2 B) og at oksidasjonen av OA til CO₂ ble betydelig redusert (Fig. 3.3 B). Dette innebar at forholdet mellom oksidert og opptatt OA også ble redusert (Fig. 3.4 B), noe som indikerte at nettoeffekten ble lipidlagring i cellene. Denne effekten vil kunne være ugunstig for cellene. 27-HC er ikke blitt undersøkt i muskel tidligere, og den funksjonelle rollen er ukjent. Flere forsøk vil være nødvendig for å finne ut mer om denne liganden.

DMHCA (N,N-dimetyl-3β-hydroksyl-choleamid) er en syntetisk LXR-ligand. Den er genselektiv, og er vist å oppregulere ABCA1 i lever, tynntarm og makrofager samtidig som den utøver minimal effekt på genuttrykket av SREBP-1c i lever. Effekten blir dermed gunstig; økt revers kolesteroltransport og minimal økning i lipogenesis i forhold til andre LXR-stimulerende stoffer (41). DMHCA så ut til å øke opptaket av OA i forsøkene i denne oppgaven (Fig. 3.2 B), mens oksidasjonen av OA så ut til å reduseres (Fig. 3.3 B). Disse resultatene stemmer ikke helt overens med teorien om at lipiddannelsen reduseres ved behandling av celler med DMHCA. Det vil imidlertid være nyttig å utføre flere forsøk med DMHCA i framtida, da

den genselektive effekten er lovende med tanke på å skille de lipogene og antiaterogene effektene som medieres av LXR.

4.6.2 Effekter på glukosemetabolismen

T0901317 har også effekter på glukosemetabolismen. Det er beskrevet økt glukoseopptak og -oksidasjon etter LXR-aktivering med T0901317 (33). I forsøkene i denne oppgaven ble det sett både økt glukoseopptak (Fig. 3.15 A) og -oksidasjon (Fig. 3.16 A) etter behandling av cellene med T0901317. Dette ble imidlertid sett bare for 1-glukose og ikke for de andre glukoseisotopene. Grunnen til dette kan være at 1-glukose omdannes i pentosefosfatveien i større grad enn de andre isotopene. Det er sannsynlig at den økte oksidasjonen sett på figur 3.16 A hovedsakelig kan tilskrives CO₂ produsert i pentosefosfatveien og ikke mitokondrielt. T0901317 øker lipogenesen, og da vil også pentosefosfatveien oppreguleres for produksjon av NADPH som trengs for lipogenese. At stimulerende effekt av T0901317 ikke ble sett for U- og 6-glukose kan muligens tilskrives det at forsøkene ble utført i medium med lav konsentrasjon av glukose. Det er foreslått at T0901317 trenger tilstedeværelse av glukose for å virke optimalt (Kase *et al.*, manuskript).

22-R-HC viste seg å påvirke glukosemetabolismen i humane muskelceller. Opptaket (Fig. 3.15 A) og oksidasjonen (Fig. 3.16 A) økte for 1-glukose, noe som antagelig kan tilskrives pentosefosfatveien. For U- og 6-glukose ble det sett en reduksjon i opptak (Fig. 3.15 A) og uendret eller litt redusert oksidasjon (Fig. 3.16 A). Det er ikke gjort utstrakte undersøkelser av effekten av 22-R-HC på glukosemetabolisme, og det kan ikke sies noe sikkert om effekten før det eventuelt er gjort flere studier.

27-HC ble også vist å påvirke glukosemetabolismen. Opptaket av 1-glukose ble signifikant økt med 27-HC, men ikke opptaket av de andre isotopene (Fig. 3.15 B). Oksidasjonen av glukose til CO₂ så imidlertid ikke ut til å være påvirket av 27-HC i nevneverdig grad (Fig. 3.16 B). Ut fra disse resultatene kan det ikke trekkes noen klar konklusjon om innvirkningen av 27-HC på glukosemetabolismen, annet enn at den ser ut til å påvirke.

DMHCA (N,N-dimetyl-3 β -hydroksyl-choleamid) ser ut til å redusere opptaket av glukose. Dette gjelder imidlertid bare for den høyeste konsentrasjonen av DMHCA (Fig. 3.15 A). Oksidasjonen av glukose ser også ut til å reduseres ved høyeste konsentrasjon av DMHCA (Fig. 3.16 B). Disse effektene er ikke gunstige, da det vil føre til hyperglykemi at mindre glukose tas opp og oksideres i muskel. Men det er nødvendig å gjøre flere forsøk med DMHCA før det kan sies sikkert hvilken innvirkning denne LXR-liganden har på glukosemetabolismen.

4.7 Konklusjoner

Den nye metoden for metabolismestudier på celler, multiwell-metoden, viste seg å være en svært nyttig metode som kan få stor anvendelse i framtida. Ved hjelp av den nye metoden oppnås store mengder data på kort tid, og det spares ressurser både i form av tid, arbeidsmengde og penger.

Glukose og lipidmetabolisme henger sammen og er nøye regulert. Celler kan variere mellom utnyttelse av fettsyrer og glukose som energisubstrat, dette kalles metabolsk fleksibilitet. Ved tilstedeværelse av glukose og insulin foretrekkes glukose som energikilde og oksideres, samtidig som fettsyreoksidasjonen undertrykkes. Metabolsk fleksibilitet er redusert hos mennesker med type 2-diabetes, noe som relateres til akkumuleringen av triglyserider i skjelettmuskulatur (IMTG) som sees hos slike pasienter. Det er mulig at denne lipidakkumuleringen påvirker insulinsignalerings og dermed bidrar til den molekylære mekanismen bak insulinresistens. I denne oppgaven er det vist at fettsyrer fra de intracellulære lagringslipidene også kan oksideres, og dersom forbruket av fettsyrer herfra kunne økes eller lagringen kunne reduseres ville mengden akkumulert fett reduseres og således gi en gunstig effekt på insulinsignalerings hos type 2-diabetikere.

Ulike ligander for LXR ble testet ut for effekt på metabolismen av oljesyre (OA) og glukose. Det ble sett en klar effekt av T0901317; økning i både opptak og oksidasjon av OA og glukose. Andre ligander som ble testet ut var 22-R-HC, 27-HC og DMHCA. Alle disse tre medførte netto lipidlagring i cellene, noe som ikke er gunstig. Det ble også vist at disse ligandene påvirket glukosemetabolismen, men effektene var ikke veldig tydelige. Etter behandling med DMHCA ble det sett hemming av opptak og oksidasjon av glukose, noe som er ugunstig da det kan medføre hyperglykemi. Det er lite trolig at noen av disse ligandene vil kunne brukes som legemidler, da de fører til ugunstige effekter på lipid- og glukoseomsetning.

Det er ønskelig å hemme den lipogene effekten av en aktivering av LXR. En hemmer av fettsyresyntase (FAS) vil teoretisk sett kunne oppnå dette. I denne oppgaven ble FAS-hemmeren cerulenin testet ut i kombinasjon med T0901317. Det økte

OA-opptaket mediert av T0901317 ble ikke hemmet av cerulenin, mens cerulenin hadde evnen til å redusere OA-oksidasjonen kraftig. Dette vil kunne medføre en økt lagring av lipider i cellen og er uønsket. Slik sett øker cerulenin den lipogene effekten istedenfor å redusere den. På den annen side er dette kun resultat fra ett enkelt forsøk, og flere forsøk må utføres før noen klar konklusjon kan trekkes.

LXR-liganden 22-S-HC ble også testet ut i disse forsøkene. Denne liganden er foreslått å være en LXR-antagonist, og det er vist at den har en mer gunstig profil i forhold til effekter på glukose- og lipidmetabolisme enn de andre LXR-ligandene. Det ble vist at fettsyreoksidasjonen ble litt redusert samtidig som opptaket og oksidasjonen av glukose i cellene økte ved behandling med 22-S-HC. Dette er effekter som er gunstige med tanke på utvikling av nye legemidler til behandling av type 2-diabetes. Mye tyder på at det er nettopp 22-S-HC man bør arbeide videre med i utviklingen av en LXR-ligand som muligens vil kunne brukes i behandlingen av type 2-diabetes.

4.8 Hva kan gjøres videre?

Identifikasjon av lever X-reseptorene har gitt ny innsikt i mekanismene som kontrollerer lipid- og karbohydratmetabolisme, og har åpnet muligheter for utvikling av nye typer legemidler. Biologiske mekanismer der LXR spiller inn, som lipogenese og lipidakkumulering, samt glukoseopptak og -omsetning, er ofte knyttet til en økt risiko for utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes når mekanismene ikke fungerer slik de skal. Aktivisering av LXR øker revers kolesteroltransport og glukoseopptak i perifere vev, men øker samtidig lipogenese og lipidakkumulering. For at ligander for LXR skal kunne utnyttes som legemidler må disse effektene skilles fra hverandre. Det er ønskelig å finne en ligand for LXR med mer spesifikk virkning, som øker revers kolesteroltransport og glukoseopptaket i skjelettmuskulatur uten samtidig å øke lipogenesen. Dersom man finner en slik ligand, vil den være svært interessant å teste ut som terapi ved behandling av for eksempel aterosklerose og type 2-diabetes. Det er foreslått at LXR β -selektive agonister vil være mest gunstige da de medierer revers kolesteroltransport samtidig som akkumulering av triglyserider i lever ikke øker i nevneverdig grad.

Den syntetiske LXR-liganden 22-S-hydroksykolesterol (22-S-HC) virker lovende med hensyn på å skille de gunstige effektene mediert av LXR fra de ugunstige. Forsøk på muskelceller har vist at 22-S-HC reduserer uttrykk av gener involvert i lipid- og kolesterolsyntese. Virkningen av 22-S-HC på cellene blir dermed redusert lipogenese, fettsyreopptak og -oksidasjon samtidig som glukoseopptak og -oksidasjon øker. Neste skritt vil da bli å undersøke effekten av 22-S-HC i andre *in vitro*-systemer som leverceller og fettceller, for å se om tilsvarende effekter kan sees der. Om de gunstige effektene sees også i andre celledsystemer, kan det etter hvert bli aktuelt å teste effektene av 22-S-HC *in vivo* i mus for å se om effektene her tilsvarer de sett på celler *in vitro*.

5. Litteraturreferanser

1. *Legemiddelhåndboka: Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell* 2004.
2. Fonseca, V.A., *The metabolic syndrome, hyperlipidemia, and insulin resistance*. Clin Cornerstone, 2005. **7**(2-3): p. 61-72.
3. Goldberg, I.J., *Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 965-71.
4. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells*. Diabetologia, 2004. **47**(8): p. 1452-61.
5. Roden, M., *Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of type 2 diabetes*. Int J Obes (Lond), 2005. **29 Suppl 2**: p. S111-5.
6. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(7): p. 1934-1941.
7. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1699-702.
8. Storlien, L., N.D. Oakes, and D.E. Kelley, *Metabolic flexibility*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 363-8.
9. Kelley, D.E., B.H. Goodpaster, and L. Storlien, *Muscle triglyceride and insulin resistance*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 325-46.
10. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 677-83.
11. Abuissa, H., D.S. Bel, and H. O'Keefe J, Jr., *Strategies to prevent type 2 diabetes*. Curr Med Res Opin, 2005. **21**(7): p. 1107-14.
12. Nakanishi, N., et al., *Components of the metabolic syndrome as predictors of cardiovascular disease and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men*. Diabetes Res Clin Pract, 2004. **64**(1): p. 59-70.
13. Smyth, S. and A. Heron, *Diabetes and obesity: the twin epidemics*. Nat Med, 2006. **12**(1): p. 75-80.
14. Robinson-Rechavi, M., H. Escriva Garcia, and V. Laudet, *The nuclear receptor superfamily*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 4): p. 585-6.
15. Olefsky, J.M., *Nuclear Receptor Minireview Series*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(40): p. 36863-36864.
16. Willy, P.J., et al., *LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway*. Genes and Development, 1995. **9**(9): p. 1033-1045.
17. Peet, D.J., B.A. Janowski, and D.J. Mangelsdorf, *The LXRs: a new class of oxysterol receptors*. Current Opinion in Genetics & Development, 1998. **8**(5): p. 571-575.
18. Juvet, L.K., et al., *On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(2): p. 172-82.
19. Edwards, P.A., H.R. Kast, and A.M. Anisfeld, *BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis*. J Lipid Res, 2002. **43**(1): p. 2-12.
20. Muscat, G.E., et al., *Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40722-8.

21. Schultz, J.R., et al., *Role of LXRs in control of lipogenesis*. Genes and Development, 2000. **14**(22): p. 2831-2838.
22. Steffensen, K.R. and J.A. Gustafsson, *Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR)*. Diabetes, 2004. **53** Suppl 1: p. S36-42.
23. Ulven, S.M., et al., *LXR is crucial in lipid metabolism*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): p. 59-63.
24. Geyeregger, R., M. Zeyda, and T.M. Stulnig, *Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(5): p. 524-39.
25. Laffitte, B.A., et al., *Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5419-24.
26. Dalen, K.T., et al., *Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48283-91.
27. Repa, J.J., et al., *Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta*. Genes Dev, 2000. **14**(22): p. 2819-30.
28. Joseph, S.B., et al., *Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11019-25.
29. Gurnell, M., *PPARgamma and metabolism: insights from the study of human genetic variants*. Clin Endocrinol (Oxf), 2003. **59**(3): p. 267-77.
30. Shimano, H., *Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes*. Prog Lipid Res, 2001. **40**(6): p. 439-52.
31. Miyazaki, M. and J.M. Ntambi, *Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **68**(2): p. 113-21.
32. Sugden, M.C. and M.J. Holness, *Skeletal muscle lipid metabolism and the adipomuscular axis*. Future Lipidology, 2006. **1**(2): p. 153-162.
33. Kase, E.T., et al., *Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1108-15.
34. Spencer, T.A., et al., *Pharmacophore analysis of the nuclear oxysterol receptor LXRA*. J Med Chem, 2001. **44**(6): p. 886-97.
35. Janowski, B.A., et al., *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 728-31.
36. Russell, D.W., *Oxysterol biosynthetic enzymes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1529**(1-3): p. 126-135.
37. Fu, X., et al., *27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38378-87.
38. Lund, E.G., et al., *Different roles of liver X receptor [alpha] and [beta] in lipid metabolism: Effects of an [alpha]-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype*. Biochemical Pharmacology, 2006. **71**(4): p. 453-463.
39. Albers, M., et al., *A novel principle for partial agonism of liver X receptor ligands. Competitive recruitment of activators and repressors*. J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 4920-30.
40. Houck, K.A., et al., *T0901317 is a dual LXR/FXR agonist*. Mol Genet Metab, 2004. **83**(1-2): p. 184-7.

41. Quinet, E.M., et al., *Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor*. J Lipid Res, 2004. **45**(10): p. 1929-42.
42. Forman, B.M., et al., *The orphan nuclear receptor LXRA α is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10588-93.
43. Kase, E.T., et al., *22-hydroxycholesterols regulate lipid metabolism differently than T0901317 in human myotubes*. Biochimica et Biophysica Acta, 2006. **In Press**.
44. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Acta Physiol Scand, 2005. **183**(1): p. 31-41.
45. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. APMIS, 2001. **109**: p. 735-44.
46. Katz, J. and G.W. Harland, *The use of Glucose-C¹⁴ for the Evaluation of the Pathways of Glucose Metabolism* The Journal of Biological Chemistry, 1960. **235**(8).
47. Jeukendrup, A.E., *Regulation of fat metabolism in skeletal muscle*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **967**: p. 217-35.
48. Kuhajda, F.P., et al., *Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6379-83.
49. Loftus, T.M., et al., *Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2379-81.
50. Jin, Y.J., et al., *Carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) activity stimulation by cerulenin via sympathetic nervous system activation overrides cerulenin's peripheral effect*. Endocrinology, 2004. **145**(7): p. 3197-204.
51. Kelley, D.E., et al., *Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. E1130-41.
52. Steffensen, K.R. and J.-A. Gustafsson, *Liver X receptors: new drug targets to treat Type 2 diabetes?* Future Lipidology, 2006. **1**(2): p. 181-189.

Tillegg

Ulike medier:

M1- medium

Utsåingsmedium:

500 ml DMEM m/ GLUTAMAX-1

50 ml FCS (føtalt kalveserum)

2.5 ml Penicillin-Streptomycin (10 000 enheter/ml-10 000 mg/ml)

2.5 ml Fungizone[®]

M2-medium

Proliferasjonsmedium:

500 ml DMEM m/ GLUTAMAX-1

10 ml FCS (føtalt kalveserum)

10 ml Ultrosor G

2.5 ml Penicillin-Streptomycin (10 000 enheter/ml-10 000 mg/ml)

2.5 ml Fungizone[®]

M3-medium

Differensieringsmedium:

500 ml DMEM m/ GLUTAMAX-1

10 ml FCS (føtalt kalveserum)

2.5 ml Penicillin-Streptomycin (10 000 enheter/ml-10 000 mg/ml)

2.5 ml Fungizone[®]

25 pmol insulin (21 µl av 1000 x fortynning av Insulin Actrapid[®] Penfill 0.6 mM)

Høstebuffer (PBS)

Til 1 liter destillert vann:

8 g NaCl

0.2 g KH₂PO₄

2.9 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O

0.2 g KCl

pH 7.4 ved 37°C